



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA ELEKTROTECHNIKY
A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ**

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

**SLEDOVÁNÍ MIGRACE MESENCHYMÁLNÍCH
KMENOVÝCH BUNĚK V EXTRACELULÁRNÍ MATRIX**

MONITORING OF MESENCHYMAL STEM CELL MIGRATION IN THE EXTRACELLULAR MATRIX

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Inna Zumberg

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Larisa Baiazitova

BRNO 2020

Diplomová práce

magisterský navazující studijní program **Biomedicínské inženýrství a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

Studentka: Bc. Inna Zumberg

ID: 185961

Ročník: 2

Akademický rok: 2019/20

NÁZEV TÉMATU:

Sledování migrace mesenchymálních kmenových buněk v extracelulární matrix

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Proveďte literární rešerši v oblasti sledování migrace buněk in vitro v extracelulární matrix (ECM). 2) Navrhněte experiment pro sledování migrace mesenchymálních kmenových buněk (MSC) v EMC. 3) Nastudujte kultivaci buněčné linie MSC a prakticky ověřte v buněčné laboratoři. 4) Ověřte navržený experiment a proveďte sběr mikroskopických dat. 5) Ve vhodném programovém prostředí zpracujte nasnímaná data. 6) Dosažené výsledky důkladně diskutujte.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] DE PASCALIS, Chiara; ETIENNE-MANNEVILLE, Sandrine. Single and collective cell migration: the mechanics of adhesions. *Molecular biology of the cell*, 2017, 28.14: 1833-1846.

[2] ZACHAR, Lukáš; BAČENKOVÁ, Darina; ROSOCHA, Jan. Activation, homing, and role of the mesenchymal stem cells in the inflammatory environment. *Journal of inflammation research*, 2016, 9: 231.

Termín zadání: 3.2.2020

Termín odevzdání: 29.5.2020

Vedoucí práce: Larisa Baiazitova

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.
předseda rady studijního programu

UPOZORNĚNÍ:

Autor diplomové práce nesmí při vytváření diplomové práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

ABSTRAKT

Tato diplomová práce obsahuje popis buněčné linie mezenchymálních kmenových buněk (MSC). Práce zahrnuje poznatky týkající se procesu migrace a diferenciací MSCs. Teoretická část této práce se zabývá problémem kultivace buněk ve 2D a 3D prostředích. Jsou zde popsány nejpoužívanější materiály pro tvorbu 3D podkladů. Praktická část obsahuje popis protokolů pasážování buněk a výsledný postup provedení experimentu. Výsledky experimentu jsou diskutovány s použitím snímků z konfokálního mikroskopu. Navržený experiment byl testován s dostatečným počtem opakování. Zpracování mikroskopických snímků bylo provedeno v programovém prostředí MATLAB.

KLÍČOVÁ SLOVA

MSC, 3D migrace, Extracelulární matrix, Kolagen, Kultivace buněk, Konfokální mikroskopie.

ABSTRACT

This master's thesis contains a description of mesenchymal stem cells (MSC). The work includes knowledge about the process of migration and differentiation of MSCs. The theoretical part of this thesis also deals with the problem of cell cultivation in 2D and 3D environments. The most used materials for creating 3D scaffolds are described here. The practical part contains the description of the cell culture protocol for passaging and also describes the experiment in the cell laboratory. The results of the experiment are discussed using confocal microscope images. The proposed experiment was tested with a sufficient number of repetitions. The processing of microscopic images was performed in the MATLAB programming environment.

KEYWORDS

MSC, 3D migration, Extracellular matrix, Collagen, Cell cultivation, Confocal microscopy.

BIBLIOGRAFICKÁ CITACE

ZUMBERG, Inna. *Sledování migrace mesenchymálních kmenových buněk v extracelulární matrix* [online]. Brno, 2020 [cit. 2020-05-29]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/126854>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav biomedicínského inženýrství. Vedoucí práce Larisa Baiazitova.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci na téma „Sledování migrace mesenchymálních kmenových buněk v extracelulární matrix“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením tohoto projektu jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědomá následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení § 152 trestního zákoníku č. 140/1961 Sb.

V Brně dne

.....

podpis autora

PODĚKOVÁNÍ

Za odborné vedení mé diplomové práce, velkou míru trpělivosti a ochoty, rychlost, lidský přístup a také za cenné a velmi podnětné rady při zpracovávání práce děkuji vedoucí práce Larise Baiazitové.

V Brně dne

.....

podpis autora

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ	1
SEZNAM TABULEK	4
ÚVOD	5
1 MEZENCHYMÁLNÍ KMENOVÉ BUNĚKY	6
1.1 Aktivita MSCs v prostředí poškozené tkáně.....	9
1.2 Migrace MSCs do místa poškození	10
1.3 Objev mezenchymálních kmenových buněk	12
1.4 Regulační signály pro zahájení diferenciací MSCs	13
2 KULTIVACE BUNĚK VE 3D PROSTŘEDÍ	15
2.1 Hlavní výhody 3D buněčných kultur	15
2.2 Extracelulární matrix	17
2.3 Požadavky na podklady pro 3D kultivaci buněk.....	19
2.4 Materiály pro tvorbu 3D podkladů.....	20
2.4.1 Kolagen	20
2.4.2 Fibronectin	21
2.4.3 Kyselina hyaluronová.....	21
2.4.4 Hydrogel.....	22
3 PRAKTICKÁ ČÁST	24
3.1 Použité přístroje a pomůcky	24
3.2 Kultivační médium a ostatní roztoky	25
3.3 Přehled použitých fluorescenčních barviv	25
3.4 Kultivace a pasážování buňkové linie MSC	26
3.5 Kultivace MSCs v kolagenovém gelu	29
3.5.1 Protokol barvení buněk MSC fluorescenčními barvivy	29
3.5.2 Protokol přípravy kolagenového gelu o koncentraci 1,5 mg·ml ⁻¹	30

3.5.3 Protokol přípravy kolagenového gelu o koncentraci $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$	30
3.5.4 Reprezentace pořízených dat.....	31
3.6 Sledování migrace MSCs v kolagenovém gelu.....	35
3.6.1 Protokol přidání fibronektinu do kolagenového gelu.....	36
3.6.2 Reprezentace pořízených dat.....	36
4 ZPRACOVÁNÍ DAT	38
4.1 Popis algoritmu navrženého v programovém prostředí MATLAB	38
4.2 Použití algoritmu pro kvantitativní analýzu experimentálních dat	41
4.2.1 I. měření	42
4.2.2 II. měření	44
4.2.3 III. měření.....	46
5 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ DAT	48
5.1 Hodnocení vlivu prostředí gelu na parametry buněčné migrace	49
5.1.1 Porovnání délek tras buněk	50
5.1.2 Porovnání rychlostí buněčné migrace	52
5.2 Hodnocení vlivu přidání fibronektinu do kolagenového gelu.....	54
6 ZÁVĚR	59
LITERATURA	62

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Mezenchymální kmenové buňky [4]	6
Obr. 2 Porovnání migrace ve 2D a 3D prostředí. 2D příklad ukazuje principy mechanobiologie, pomocí které buňka čte (zelené šipky) mechanické vlastnosti ECM a převádí je na biochemický intracelulární signál (červená šipka), který ovlivňuje cytoskelet, signalizaci a transkripci. Nakonec buňka reaguje jak působením sil na samotný podklad (modrá šipka), tak aktivací procesů, jako je proliferace, apoptóza, diferenciaci a migrace (velká modrá šipka). Situace je složitější u 3D migrace, ve které se buňky mohou pohybovat uvnitř ECM, složené z vláken (označené oranžově) různého složení, struktury, topologie a dalších nemigrujících buněk (označené červeně). V této složité situaci musí buňky integrovat signály vysílané různými typy fokálních adhezí a spojů. [10]	16
Obr. 3 Extracelulární matrix ve vztahu k buněčné membráně [15]	18
Obr. 4 Syntetický hydrogel (A) složený ze syntetických polymerů (žluté pletivo) poskytuje 3D prostředí pro kultivaci buněk; neumožňuje však aktivaci integrinů (označené červeně) a dalších povrchových receptorů (označené oranžově). Naopak biohybridní hydrogel (B) aktivuje vazebné místa integrinu (označené zeleně) a poskytuje růstové faktory, umožňuje komunikaci buňky s ECM (žlutá vlákna), která řídí chování buněk prostřednictvím signálních kaskád. Podporuje tak proliferaci, růst, vývoj a migraci buněk. [25]	23
Obr. 5 Excitační a emisní spektrum CellTracker™ Green CMFDA [26]	26
Obr. 6 Excitační a emisní spektrum CellTracker™ Red CMTPX [26]	26
Obr. 7 Bürkerova komůrka [30]	28
Obr. 8 Rekonstrukce 3D buněčného prostředí po jedné hodině inkubace (prostorové zobrazení, koncentrace kolagenu 1,5 mg·ml ⁻¹). Buňky obarvené CellTracker™ Green CMFDA jsou označeny zeleně, buňky obarvené CellTracker™ Red CMTPX jsou označeny červeně	31
Obr. 9 Rekonstrukce 3D buněčného prostředí po 24 hodinách inkubace (koncentrace kolagenu 1,5 mg·ml ⁻¹): (A) buňky obarvené CellTracker™ Green CMFDA (pohled shora) (B) buňky obarvené CellTracker™ Red CMTPX (pohled shora) (C) buňky obarvené CellTracker™ Green CMFDA (pohled zepředu) (D) buňky obarvené CellTracker™ Red CMTPX (pohled zepředu)	32

Obr. 10 Rekonstrukce 3D buněčného prostředí po 96 hodinách inkubace (koncentrace kolagenu $1,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$): (A) buňky obarvené CellTracker™ Green CMFDA (pohled shora) (B) buňky obarvené CellTracker™ Red CMTPIX (pohled shora) (C) buňky obarvené CellTracker™ Green CMFDA (pohled zepředu) (D) buňky obarvené CellTracker™ Red CMTPIX (pohled zepředu)	33
Obr. 11 Reprezentace buněk MSC kultivovaných v kolagenovém gelu po 24 hodinách inkubace (koncentrace kolagenu $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$). Buňky obarvené CellTracker™ Green CMFDA jsou označeny zeleně, buňky obarvené CellTracker™ Red CMTPIX jsou označeny červeně: (A) pohled shora (B) pohled zepředu	34
Obr. 12 Snímky buněk MSC po 16 hodinách inkubace: (A) v médiu (kontrolní skupina) (B) v kolagenovém gelu (C) v kolagenovém gelu s přidavkem fibronektinu ($10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) (D) v kolagenovém gelu s přidavkem fibronektinu ($50 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	37
Obr. 13 Schéma navrženého algoritmu (celltrack.m)	38
Obr. 14 Ukázka běhu funkce celltrack.m (červeně jsou označeny již sledované buňky)	39
Obr. 15 Znázornění celkové uražené vzdálenosti a Euklidovy vzdálenosti: $d_{i,\text{accum}}$ značí celkovou uraženou vzdálenost, $d_{i,\text{euklid}}$ je Euklidova vzdálenost, černým puntíkem je označen konečný bod migrace (cell endpoint), M_{end} je těžiště migrace, M_{start} je počáteční bod migrace [32]	40
Obr. 16 Ukázka směrové růžice pro 20 sledovaných buněk.....	40
Obr. 17 Spočítané rychlosti pohybu jednotlivých buněk (průměrná rychlost pohybu všech sledovaných buněk je označena čárkovanou čarou)	41
Obr. 18 Směrová růžice pro I. měření: (A) kontrolní skupina (B) kolagenový gel (C) kolagenový gel/fibronektin ($10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) (D) kolagenový gel/fibronektin ($50 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$).....	43
Obr. 19 Směrová růžice pro II. měření: (A) kontrolní skupina (B) kolagenový gel (C) kolagenový gel/fibronektin ($10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) (D) kolagenový gel/fibronektin ($50 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$).....	45
Obr. 20 Směrová růžice pro III. měření: (A) kontrolní skupina (B) kolagenový gel (C) kolagenový gel/fibronektin ($10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) (D) kolagenový gel/fibronektin ($50 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$).....	47
Obr. 21 Krabicový diagram délek tras buněk pro I. měření	50
Obr. 22 Krabicový diagram délek tras buněk pro II. měření	50

Obr. 23 Krabicový diagram délek tras buněk pro III. měření.....	50
Obr. 24 One-way ANOVA (celková uražená vzdálenost, 1.test, I. měření)	51
Obr. 25 One-way ANOVA (celková uražená vzdálenost, 1.test, II. měření)	51
Obr. 26 One-way ANOVA (celková uražená vzdálenost, 1.test, III. měření).....	51
Obr. 27 Krabicový diagram rychlostí buněčné migrace pro I. měření	52
Obr. 28 Krabicový diagram rychlostí buněčné migrace pro II. měření	52
Obr. 29 Krabicový diagram rychlostí buněčné migrace pro III. měření.....	52
Obr. 30 One-way ANOVA (průměrná rychlost pohybu buněk, 1.test, I. měření)	53
Obr. 31 One-way ANOVA (průměrná rychlost pohybu buněk, 1.test, II. měření)	53
Obr. 32 One-way ANOVA (průměrná rychlost pohybu buněk, 1.test, III. měření).....	53
Obr. 33 One-way ANOVA (2.test, I. měření)	54
Obr. 34 One-way ANOVA (2.test, II. měření)	54
Obr. 35 One-way ANOVA (2.test, III. měření).....	54
Obr. 36 Krabicový diagram čistých vzdáleností pro I. měření	57
Obr. 37 Krabicový diagram čistých vzdáleností pro II. měření.....	57
Obr. 38 Krabicový diagram čistých vzdáleností pro III. měření	57
Obr. 39 One-way ANOVA (3.test, I. měření)	58
Obr. 40 One-way ANOVA (3.test, II. měření)	58
Obr. 41 One-way ANOVA (3.test, III. měření).....	58

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Parametry měření.....	36
Tab. 2 Tabulka celkových vzdáleností a rychlostí migrace v prvním měření	42
Tab. 3 Tabulka celkových vzdáleností a rychlostí migrace v druhém měření	44
Tab. 4 Tabulka celkových vzdáleností a rychlostí migrace ve třetím měření	46
Tab. 5 F-test.....	49
Tab. 6 One-way ANOVA (celková uražená vzdálenost, 1.test).....	51
Tab. 7 One-way ANOVA (průměrná rychlost pohybu buněk, 1.test).....	53
Tab. 8 One-way ANOVA (2.test).....	54
Tab. 9 F-test.....	55
Tab. 10 One-way ANOVA (3.test).....	55
Tab. 11 Tabulka hodnot Euklidovy vzdálenosti pro všechna měření.....	56

ÚVOD

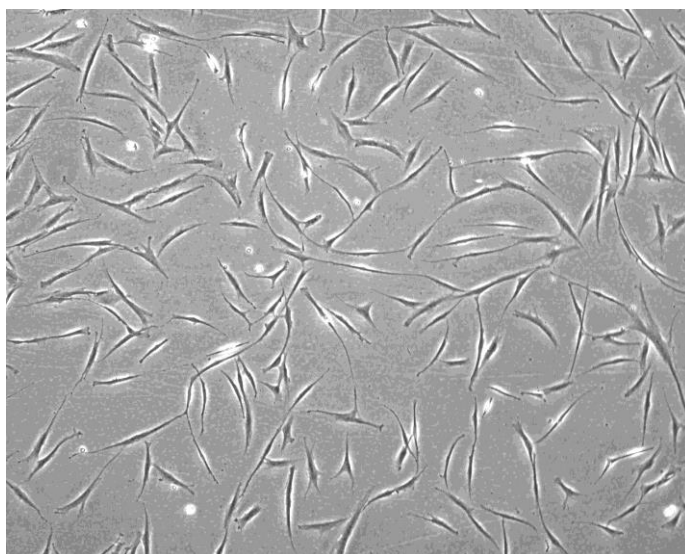
Buněčná migrace a invazivita hrají podstatnou úlohu v řadě biologických procesů, jako je např. embryogeneze, imunitní odpověď, hojení ran, morfogeneze či zánět. Tisíce publikací objasnily podrobné molekulární a biofyzikální mechanismy migrace buněk kultivovaných na plochých 2D substrátech ze skla a plastu. [1]

O tom, jak se buňky chovají ve 3D prostředí živých tkání, je však mnohem méně známo. V složitějších, přirozených prostředích buňky využívají různé způsoby migrace. Tyto buňky jsou řízeny lokálním extracelulárním mikroprostředím, specifickými způsoby signalizace a nesvalovou myosinovou kontraktilitou. Migrace buněk ve 3D prostředí je náročná, protože vyžaduje, aby se buňka protlačila složitými nebo hustými extracelulárními strukturami. Vyžaduje to také specifickou buněčnou adaptaci na mechanické vlastnosti extracelulární matrix (ECM). Kromě navigace v prostředí ECM a překonávání extracelulárních bariér navíc buňky často interagují se sousedními buňkami a tkáněmi prostřednictvím fyzických a signálních interakcí. [1]

Proto byly zavedeny nové modelové systémy zahrnující mikrofluidní zařízení, biogely a scaffoldy. Poskytují koncepční pohled na průběh migrace buněk ve 3D prostředí a napomáhají bližšímu pochopení mechanismů ovlivňujících tuto migraci. Takové systémy se navrhují s cílem věrně napodobit přirozené prostředí buněk. Potenciál využití těchto systému v tkáňovém inženýrství a regenerativní medicíně je obrovský, což potvrzuje aktuálnost tématu práce.

1 MEZENCHYMÁLNÍ KMENOVÉ BUŇKY

Mezenchymální kmenové buňky (MSC) jsou nehematopoetické kmenové buňky označovány také jako mezenchymální stromální buňky nebo stromální buňky kostní dřene (viz Obr. 1). Jsou to primitivní buňky, které se vyvíjejí ze zárodečné vrstvy mezodermy. MSCs jsou vhodnými kandidáty pro použití v regenerativní medicíně a buněčné terapii. Mají velký potenciál diferencovat se na různé buněčné typy a mohou být izolovány z různých tkání v požadovaném množství. [2] [3]



Obr. 1 Mezenchymální kmenové buňky [4]

MSCs patří mezi autologní buňky, mají schopnost inhibovat buněčnou proliferaci indukovanou alloantigenem a inhibovat produkci cytokinů, a potlačovat tak autoimunitní a transplantační reakce in vivo. Mezenchymální kmenové buňky přispívají k obnově poškozené tkáně nebo orgánů prostřednictvím různých mechanismů usnadňujících reparativní a regenerativní procesy a také samotnou imunomodulací a diferenciací do buněk cílové tkáně. Také mají schopnost vytvářet imunomodulační mikroprostředí, a tak pomáhají minimalizovat poškození orgánů způsobené zánětem a buňkami aktivovanými imunitním systémem. Například bylo dokázáno, že transfer mezenchymálních kmenových buněk potlačuje autoimunitu, prodlužuje přežití kožních štěpů u potkanů a indukuje trvalé přijetí allogenních Langerhansových ostrůvků u myší. [3]

V současné době existuje velmi srozumitelná představa o tom, jak MSCs ovlivňují imunitní systém, zejména ve vztahu k poškození tkání a orgánů na imunologickém základě. Až dosud bylo popsáno mnoho účinných mechanismů, kterými MSC ovlivňují

imunitní odpověď. Tyto mechanismy zahrnují sekreci rozpustných bioaktivních látek, indukci regulace T-lymfocytů, modulaci tolerogenních dendritických buněk, stejně jako indukci anergie (neschopnost reakce lidského imunitního systému proti cizí látce zapříčiněnou přímou indukcí tolerance v periferních lymfocytech) a apoptózy. MSCs jsou tedy schopny ovlivňovat vrozené i adaptivní imunitní mechanismy. [3]

Mezenchymální kmenové buňky byly původně popisovány jako adherentní populace fibroblast-podobných buněk lokalizovaných v kostní dřeni, které jsou schopné osteogenní diferenciaci. Následně bylo ukázáno, že tyto multipotentní buňky lze nalézt ve všech tkáních, které jsou schopné regenerace a jsou umístěny typicky v perivaskulárních výklencích v podobě pericytů exprimující CD146. Ne všechny MSCs však lze považovat za ekvivalent pericytů, ani všechny pericyty nemají charakteristické vlastnosti MSC. [3]

V současné době jsou MSCs rutinně izolovány z různých tkání. Hlavním zdrojem mezenchymálních kmenových buněk je kostní dřeň, kde však tvoří pouze 0,01 % – 0,001 % z celkové populace buněk nacházejících se v kostní dřeni. Kromě kostní dřeně se MSCs nacházejí v mnoha dalších tkáních, jako například v tukové tkáni, pupečnickové krvi, plicích a játrech. Tyto buňky mají pozoruhodnou schopnost proliferace in vitro; je tedy možné rychle získat požadovaný počet buněk pro experimentální použití nebo pro cílenou buněčnou terapii. MSCs hrají klíčovou roli při udržování homeostázy a zrání hematopoetických buněk v kostní dřeni. [2] [5]

MSCs jsou charakterizovány expresí různých povrchových antigenů, ale žádný z nich není exprimován pouze těmito buňkami. Mezinárodní společnost pro buněčnou terapii proto vydala pokyny, kterými jsou MSCs definovány na základě těchto tří kritérií [3] :

1. za standardních kultivovacích podmínek jsou schopné přilnout k plastickému povrchu a vytvářet kolonie,
2. nesou markery CD105, CD73, CD44, CD71 a CD90, zatímco nenesou markery typické pro hematopoetické kmenové buňky (CD34, CD45, CD11a, CD19 či CD79a, CD14 či CD11b) ani kostimulační molekuly CD80 a CD86,
3. MSCs musí mít schopnost diferencovat in vitro na osteocyt, adipocyt nebo chondrocyt.

Tyto hlavní charakteristiky se obecně vztahují na MSC odvozené z kostní dřeně (BMSC). Jak odhalila různá studia, MSC izolované z různých tkání nejsou přesně ekvivalentní a představují vysoce heterogenní populace buněk, které jsou dramaticky ovlivněny různými vnějšími a vnitřními faktory. Proto musí být zajištěna bezpečnost,

účinnost, reprodukovatelnost kultivace MSCs. Nejčastější otázky se proto týkají způsobilosti a screeningu dárců, různých typů protokolů izolace buněk, používání různých činidel, zejména médií a doplňků živočišného nebo lidského původu, a kontrol zajišťujících bezpečnost a sledovatelnost konečného produktu. Je však třeba se zabývat i některými dalšími důležitými otázkami, jako jsou např. kontrola životního prostředí a obavy ze skladování buněk. V posledních letech byla vyvinuta spousta optimalizovaných protokolů pro kultivaci a přípravu MSCs, byly vytvořeny různé nástroje a markery pro charakterizaci těchto buněk. Mnoho úsilí bylo věnováno popisu buněk a ovlivnění jejich diferenciaci a imunomodulačního potenciálu in vitro a in vivo. [3]

Typickou vlastností MSCs je jejich schopnost diferencovat na široké spektrum buněčných typů, které jsou nejen mezenchymálního původu. Proces diferenciaci však vyžaduje působení specifických růstových faktorů a chemických mediátorů. Kromě toho je proces diferenciaci ovlivňován mnoha dalšími faktory jako je hustota buněk a jejich uspořádání, typ tkáně, ze které byly izolovány buňky, věk dárce, stav buněčné kultury a číslo pasáže, různé elektrické a mechanické síly a fyzikální vlastnosti substrátu nebo nosiče. [3]

MSCs vylučují širokou škálu různých růstových faktorů, cytokinů a adhezních molekul, díky nimž ovlivňují mikroprostředí degenerující cílové tkáně a udržují tak pozitivní parakrinní účinek na opravu tkáně. Protože MSCs vykazují významné imunomodulační vlastnosti, jsou schopny uniknout z mechanismů rozpoznávání imunitního systému a modulovat obranné mechanismy hostitele. Proto mohou sloužit jako imunomodulátory pro udržování periferní nebo transplantační tolerance. MSCs jsou schopny ovlivnit mnoho funkcí aktivovaných T buněk, B buněk a NK buněk a mohou také ovlivnit funkce dendritických buněk (DC), monocytů, makrofágů, neutrofilů a žírných buněk. MSCs mohou zprostředkovat svou imunomodulační aktivitu v mnoha případech, jako je například diabetes mellitus typu 1, experimentální autoimunitní encefalomyelitida (EAE), pohmoždění mozku a jeho následné poškození související se zánětem a mnoha dalších. Mohou také působit jako primární matrice v procesech opravy tkáně způsobených zánětem a poraněním. Vzhledem k vysoké afinitě k nádorové tkáni mohou MSCs také sloužit jako cílené nosiče terapeutických činidel v protinádorové terapii. [3]

1.1 Aktivita MSCs v prostředí poškozené tkáně

Klíčovým faktorem přežití mnohobuněčných organismů je udržování homeostatické rovnováhy. Za normálních okolností jsou apoptotické buňky odstraněny, aniž by způsobily zánět, rezidentními fagocytárními buňkami. Na druhé straně je akutní poškození tkáně obvykle doprovázeno zánětem a buněčnými složkami uvolňovanými z nekrotických buněk. Mikrovaskulární poškození vede ke zvýšené vaskulární permeability a následné infiltraci makrofágů a neutrofilů. Proces fagocytózy nekrotických buněk vede k uvolňování prozánětlivých mediátorů, jako je interferony (IFN- γ), tumor nekrotizující faktor- α (TNF- α), interleukin-1 (IL-1), různých chemokinů, leukotrienů a volných radikálů. Kromě vrozené imunitní odpovědi je poškození a oprava tkáně úzce spojeno s působením adaptivních imunitních mechanismů zahrnujících CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocyty a B-lymfocyty. [3]

V případě poškození tkáně začnou MSCs umístěné v bezprostřední blízkosti nebo pocházející z kostní dřeně migrovat do místa poranění. Jakmile MSCs dosáhnou místa poškození, musí úzce spolupracovat s různými typy stromálních a zánětlivých buněk, aby se mohly účastnit opravných a regeneračních procesů poškození. Ukázalo se, že existují vzájemné interakce mezi MSCs a zánětlivými buňkami, které na konci určují výsledky procesů opravy poškozených tkání zprostředkovaných MSCs. Tyto podstupující mechanismy jsou velmi složité, kde hrají hlavní roli modulační faktory produkované MSCs. Tyto mechanismy se však mezi různými druhy liší. Mnoho z těchto faktorů se uvolňuje do exosomů, malých membránových váčků účastnících se buněčné komunikace. Pokud jde o opravu a regeneraci poškozené tkáně, exosomy z MSC mají podobné funkce jako MSCs, ale o imunomodulačním účinku těchto vesikul je známo jen málo. [3]

Několik studií prokázalo, že MSC jsou schopny produkovat širokou škálu růstových faktorů, jako je transformující růstový faktor β (TGF- β), hepatocytový růstový faktor (HGF), epidermální růstový faktor (EGF), fibroblastový růstový faktor (FGF), vaskulární endoteliální růstový faktor, destičkový růstový faktor (PDGF), inzulinu podobný růstový faktor 1 (IGF-1), faktor 1 odvozený od stromálních buněk (SDF-1) a angiopoietin-1. Tyto růstové faktory následně podporují vývoj progenitorových buněk, fibroblastů a endoteliálních buněk, které potom podporují regeneraci a opravu tkání. Po odpovídající prozánětlivé stimulaci jsou MSCs také schopny produkovat další důležité imunomodulační faktory. MSCs jsou také schopny inhibovat proliferaci NK buněk a také omezit jejich cytotoxickou aktivitu a sekreci cytokinů. Odpovídajícím způsobem je také negativně ovlivněna proliferace B-lymfocytů a produkce protilátek. [3]

V průběhu působení jsou MSCs schopné in vitro a in vivo transformace do mnoha typů imunitních buněk. Schopnost modulovat imunitní odpověď je zprostředkována působením složitých mechanismů souvisejících většinou s produkcí imunosupresivních trofických faktorů. MSCs jsou schopny inhibovat proliferaci T pomocných (Th) a cytotoxických T buněk. Kromě toho indukce diferenciací Th2 a regulačních T buněk (Treg) vede k indukci protizánětlivého prostředí. [3]

1.2 Migrace MSCs do místa poškození

Proces migrace je představován několika výraznými kroky a začíná rezistencí a adhezivními interakcemi mezi buňkami protékajícími krevním řečištěm a vaskulárním endoteliem. První krok je zprostředkován receptory exprimovanými na cirkulujících buňkách, které interagují s odpovídajícími ko-receptory prezentovanými na endotelu. Jejich interakce vede k připojení cirkulujících buněk k endotelu. Tento krok je obvykle spojen s aktivací integrinů indukovanou chemokiny, těsnou adhezí cirkulujících buněk k endotelu a následnou extravazací. Pro úspěšnou cílenou buněčnou terapii je kriticky důležité řídit adhezi buněk k extracelulární matrix cílové tkáně (ECM) prostřednictvím exprese specifických adhezních molekul. MSCs exprimují velké množství adhezních molekul, které zahrnují integriny a selektiny. MSCs také exprimují molekulu CD44, která je receptorem hyaluronové kyseliny a může interagovat s jinými ligandy, jako je např. osteopontin, kolagen a matricové metaloproteinázy (MMP). Dalším faktorem zapojeným do procesu je fibronectin (FN), který se váže na složky ECM, jako je kolagen, fibrin a heparan sulfát. Tyto interakce hrají zásadní roli v procesech buněčné adheze, růstu, migrace, diferenciací a hojení ran. Fragmentace fibronectinu iniciuje další expozici V-oblasti obsahující vazebné místo pro integrin $\alpha 4/\beta 1$ exprimovaný na MSC. Tyto fragmenty fibronectinu způsobují zvýšení vazebné síly $\alpha 4/\beta 1$ integrin exprimujících buněk, což jim umožňuje adherovat k okolní matici. Interakce mezi $\alpha 4/\beta 1$ integrinem a fibronectinem hraje důležitou roli v procesu transmigrace MSCs do ECM. Poslední krok v procesu transmigrace MSCs do ECM je také usnadněn interakcemi MSC s integriny, spojovacími adhezními molekulami a kadheriny. [3]

Bylo zjištěno, že migrační schopnost MSC je pod přísnou kontrolou širokého spektra růstových faktorů, jako je PDGF nebo IGF-1. Zjištění této studie však naznačují, že pouze omezený počet BMSC používaných při systémových transplantacích má schopnost navádění směrem k poraněné tkáni. Byl identifikován molekulární podpis, který definuje tuto populaci, a povrchový marker PDGFRp lze použít pro potenciální izolaci BMSC se zvýšenou migrační kapacitou. Nedávná data také ukazují funkční asociaci mezi in vivo schopností formování kostí a naváděcí

kapacitou BMSC. Proto lze PDGFRp použít jako potenciální marker pro budoucí výběr populací BMSC s vysokou migrační schopností a schopností tvorby kosti. [3]

Základní fibroblastový růstový faktor (bFGF) a MMP jsou další faktory, které mohou modulovat navádění MSCs. bFGF může zvýšit migrační aktivitu MSCs prostřednictvím aktivace signální dráhy Akt. V závislosti na koncentraci bFGF však může mít její funkce opačný účinek na navádění MSCs. Ukázalo se, že nízké koncentrace bFGF vedou k přitahování buněk, zatímco vyšší koncentrace má opačný účinek. Toto ambivalentní působení bFGF poskytuje další příležitost pro cílení navádění MSCs. MMP-2 je další aktivní molekula exprimovaná MSCs, podílející se na degradaci kolagenu IV, hlavní složky bazální membrány. Ukázalo se, že MMP-2 exprimovaný MSCs je funkčně zapojen do procesu transмиграce přes endotel. [3]

V posledních několika letech došlo k významnému pokroku v procesu porozumění složitým krokům zahrnutým v modulaci imunitních odpovědí zprostředkovaných MSCs. Konečný osud MSCs v místním mikroprostředí a přesné mechanismy, kterými tyto buňky působí parakrinním způsobem proti sousedním somatickým a progenitorovým buňkám, musí být ještě podrobně objasněny. Některé z významných imunomodulačních účinků jsou založeny na odlišných vlastnostech MSCs. K provedení modulačních funkcí však musí být MSCs aktivovány prozánětlivými cytokiny. Počáteční data podporují paradigma, že MSCs jsou citlivé na působení mikroprostředí. Tato studie navrhuje, že jak koncentrace, tak trvání stimulu mají důležitou roli v procesu polarizace MSCs. Konečná modulační aktivita MSCs tedy závisí na působení různých faktorů spojených s protichůdnými účinky. Obecně však tyto interakce nakonec vedou k funkční polarizaci MSCs směrem k inhibičnímu a méně k prozánětlivému fenotypu. Rovněž se zdá, že ani dlouhodobá implantace, nebo v některých případech dokonce pouhá lokalizace MSCs v lézi, není nezbytná pro to, aby MSCs uplatňovaly svou imunomodulační a prozatímní schopnost. MSCs mají potenciál modulovat a přeprogramovat funkce buňky imunitního systému, a tak podporovat imunitní obranu hostitele nebo inhibovat zánětlivé procesy. Navíc, vzhledem k nízké imunogenitě a schopnosti migrovat na místa poškození tkáně, mohou MSCs sloužit jako nosiče terapeutických činidel. Jako součást stromatu u některých nádorů lze MSCs použít v protinádorové terapii. Je však třeba dále zkoumat nejen konečné mechanismy působení, ale také řadu událostí, které se vyskytují v různých krocích imunomodulace. Je také nutné zabývat se otázkami, jak manipulovat a ovlivňovat MSCs k dosažení požadovaného stupně diferenciace a jak modulovat jejich naváděcí schopnosti. [3]

1.3 Objev mezenchymálních kmenových buněk

Dva vědci Alexander Maximov (1874–1928) a Alexander Friedenstein (1924–1998) vynikají v ruské experimentální hematologii a dnes jsou jejich zásluhy celosvětově uznávány. Setkali se s podobným osudem. Oba začali svou lékařskou kariéru na Vojenské lékařské akademii v Petrohradu. Jejich teorie o kmenových buňkách předběhla dobu a setkala se se skepticismem. Z toho důvodu byly zásluhy obou podceňovány během jejich života. Nakonec vědecké koncepty Maximova a Friedensteina představují experimentální základnu pro transplantaci krvetvorných kmenových buněk a pro vývoj různých přístupů k buněčné terapii a jejich důsledků. Je pozoruhodné, že Maximov předpokládal jednotnou teorii krvetvorby a koncept krvetvorných kmenových buněk (HSC) a Friedenstein objevil dospělé mezenchymální kmenové buňky v kostní dřeni. [6]

Friedenstein propagoval porozumění a pozitivní hodnocení Maximovova dědictví: obnovil dobré jméno Maximovova v Rusku, kde byl Maximov po revoluci v roce 1917 zdiskreditován a jeho práce byla nespravedlivě zapomenutá. Byl to Friedenstein, který podrobně studoval hlavní etapy Maximovova výzkumu v Rusku, Německu a USA, spolu s ruskými a zahraničními kolegy (M. Tavassoli, D. Rowley) a zdůraznil velký význam Maximovových základních studií v hematologii. [6]

Friedenstein a Maximov objevili dospělé MSCs poprvé před více než 40 lety. Byly popsány jako klonogenní buňky odvozené od kostní dřene, přilnavé k plastu, schopné diferenciaci na osteoblasty, adipocyty a chondrocyty. Poté různé výzkumné skupiny uváděly různé populace nebo podmožiny stromálních buněk kostní dřene, které sdílejí podobné, ale ne identické rysy s původně popsanými MSCs. Tyto další buňky se označují jako stromální kmenové buňky kostní dřene (BMSSC, bone marrow stromal stem cells), z dřene izolované multipotentní indukovatelné buňky (MIAMI, marrow-isolated adult multipotent inducible cells), multipotentní progenitorové buňky (MAPC, multipotent adult progenitor cells) a mezenchymální dospělé kmenové buňky (MASC, mesenchymal adult stem cells). Tyto buňky jsou buď buňky podobné MSC, nebo obsahují částečně se překrývající populaci MSCs. MSCs obecně vykazují významnou heterogenitu. Dosud ale neexistuje jednotně přijímaný jasný a specifický definitivní fenotyp nebo povrchové markery pro potenciální izolaci MSCs. Místo toho jsou MSCs definovány retrospektivně konstelací charakteristik *in vitro*, včetně kombinace fenotypových markerů a funkčních vlastností. [7]

Přestože byly MSCs původně izolované z kostní dřene, bylo zjištěno, že MSCs a MSC podobné buňky jsou také obsaženy v jiných tkáních. Například MSCs mohou

být izolovány ze stromální vaskulární frakce tukové tkáně a mohou exprimovat CD34 a aktin hladkého svalstva. Tyto kmenové buňky se mohou obnovovat po mnoho pasáží a mohou být indukovány k diferenciaci na tukovou tkáň, svaly, kosti, chrupavky a endotel. [7]

MSCs izolované z různých tkání vykazují podobné fenotypové vlastnosti. Vykazují však různou schopnost k proliferaci a diferenciaci v závislosti na stimulaci růstovými faktory. Studie, která srovnávala lidské MSCs odvozené z kostní dřeně, okostice, synoviální membrány, kosterního svalu a tukové tkáně, odhalila, že MSCs odvozené ze synoviální membrány vykazovaly nejvyšší kapacitu pro chondrogenezi, následovaly MSCs odvozené z kostní dřeně a pak z okostice. Metody izolace, kultivační médium, množství buněk v kultivační ládvi, stejně jako přidání různých růstových faktorů a chemikálií ovlivňují růst, diferenciaci a imunogenní vlastnosti MSCs. Navíc věk dárců a stadium nemoci mohou také ovlivnit výtežek MSC, míru proliferace a diferenciační potenciál. [7]

Různé tkáňově-specifické kmenové buňky se liší ve fenotypu, morfologii, proliferačním potenciálu a kapacitě diferenciaci, ale vykazují mnoho společných charakteristik připisovaných jejich protějškům izolovaným z kostní dřeně, což naznačuje, že populace MSC podobných buněk mají podobnou ontogenezi. Nové důkazy naznačují, že perivaskulární výklenek je běžným mikroprostředím kmenových buněk pro rezidentní populace MSC podobných buněk v různých tkáních. Nedávno bylo publikováno, že MSCs izolované z dospělých a fetálních buněk jsou pozitivní na perivaskulární marker CD146 a vykazují schopnost diferenciaci na adipogenní, osteogenní a chondrogenní buněčné linie. [7]

1.4 Regulační signály pro zahájení diferenciaci MSCs

Regulační signály růstových faktorů jsou posílány přes specifické signální transdukční dráhy. S ohledem na chondrogenní diferenciaci indukovanou růstovým faktorem je známo, že jsou aktivovány různé intracelulární signální dráhy, což indukuje následnou aktivaci několika specifických transkripčních faktorů (sox9, sox5 a sox6). Příkladem takové intracelulární signální dráhy je mitogenem aktivované proteinové kinázy (MAPK). Aktivace transkripčních faktorů vede k produkci proteinů extracelulární matrix (ECM), včetně kolagenu typu II, agrekanu a proteinu oligomerní matrice chrupavky, které jsou potřebné pro tvorbu chrupavky. Sox9 je jednou z nejdůležitějších molekul pro vývoj chrupavkového fenotypu. Bylo prokázáno, že

exprese exogenního sox9 v MSCs odvozených z kostní dřeně vede ke zvýšenému ukládání proteoglykanu. Sox9 je nyní v chondrogenezi považován za „hlavní spínač“. [7]

Kromě růstových faktorů hrají klíčovou roli pro zahájení diferenciace MSCs i další chemikálie. Například inkubace MSC s dexamethasonem, inzulinem, isobutylmethyl xanthinem a indomethacinem může preferenčně podporovat jejich diferenciaci směrem k adipogenní linii. V buňkách se hromadí vakuoly bohaté na lipidy a exprimují receptor g2 aktivovaný proliferací peroxisomů, lipoprotein lipázu a adipocytární protein vázající mastné kyseliny aP2. Lipidové vakuoly se nakonec kombinují a vyplňují buňky. Bylo také popsáno, že po přidání 5-azacytidinu a amfotericinu B se MSCs diferencují na myoblasty. Zásobování nikotinamidem a beta-merkapt ethanolom [2-ME] indukuje diferenciaci MSCs do ostrůvkových b-buněk. Dále, relativně jednoduchými chemickými prostředky (ošetření dimethylsulfoxidem [DMSO] a butylovaným hydroxyanisolem [BHA]) mohou být indukovány MSCs k diferenciaci na buňky podobné neuronům. [7]

I když jsme pochopili řadu cest, které zprostředkovávají transdukcí signálu indukovanou růstovými faktory v procesu diferenciace MSCs, molekulární mechanismy, které jsou základem chemicky indukované specifikace MSCs, zůstávají většinou neznámé. Kromě toho je málo známo molekulárních mechanismů in vivo, protože mnoho z látek testovaných in vitro přirozeně neexistuje u lidí nebo experimentálních zvířat. Porozumění těmto molekulárním kaskádám stále má prvořadou důležitost, protože může přinést nové příležitosti pro porozumění některým environmentálním chorobám a/nebo vývoj nových farmakologických terapeutických látek. [7]

2 KULTIVACE BUNĚK VE 3D PROSTŘEDÍ

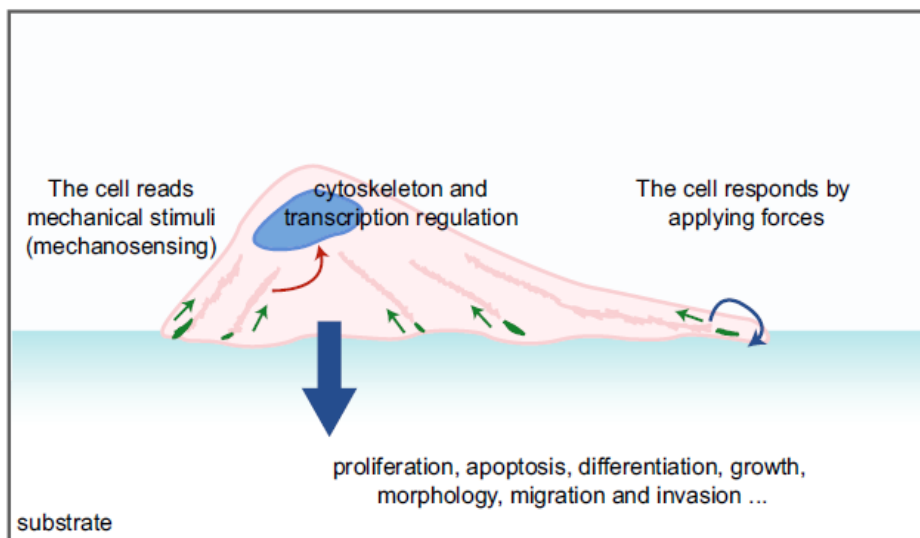
Jako buněčné kultury se označují kultury buněk, kultivované v laboratoři, v podmínkách, jež napodobují jejich přirozené prostředí. Využití buněčných kultur je nesmírně široké. Experimenty se nejčastěji provádějí na 2D buněčných kulturách, kdy buňky přisedají v jedné vrstvě na různé povrchy, např. plasty. Tyto 2D kultury buněk, však nejsou obklopené svým přirozeným mikroprostředím a jejich reakce na různé chemické látky či jiné podněty se může výrazně lišit od buněk vyskytujících se v živém organismu. [8]

Proto se začaly provádět výzkumy kultivace buněčných kultur v trojrozměrném (3D) prostředí s objemovou architekturou. Taková 3D prostředí poskytují potřebnou podporu pro nově vznikající aplikace v tkáňovém inženýrství a výzkum kmenových buněk. Biokompatibilní scaffoldy, nebo podklady (např. hydrogel nebo kolagen) ukázaly potenciál při kultivaci specifických typů buněk a při zkoumání různých aspektů interakce buňka-matrix ve 3D prostředí. Scaffoldy jsou uměle vytvořené porézní struktury předem definovaných tvarů, které slouží jako nosiče buněčných kultur. Mikrofluidní zařízení s formovanými mikrokánaly obsahujícími biopolymery jsou nyní k dispozici pro podporu provedení specifických 3D aplikací, např. invazivních nebo migračních testů. Začínají se objevovat systémy přímo podporující automatizaci vytvoření 3D buněčné kultury a/nebo tkání, příkladem je tzv. 3D-bioprinting. Základem 3D biotisku je vytvoření trojrozměrné struktury z vhodných biomateriálu, do které se určitým způsobem přidávají buňky. 3D-bioprinting může být použit například při testování nových léků nebo zjišťování účinků chemických látek či virů na organismus. Perspektiva rozvoje fyziologicky relevantnějších 3D modelů pro použití v toxikologii *in vitro* je obzvláště přesvědčivá. Ve vzdálenější budoucnosti by podobná zařízení mohla vyřešit momentální nedostatek vhodných orgánů pro transplantace. [9]

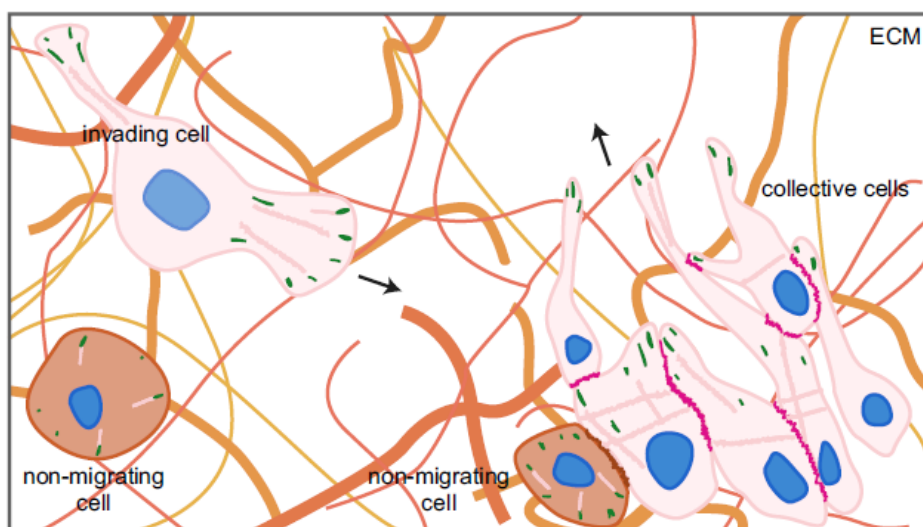
2.1 Hlavní výhody 3D buněčných kultur

Abychom lépe pochopili, co je hnacím motorem zkoumání 3D buněčné kultury, pokusme se nejprve identifikovat, co je vnímáno jako nejdůležitější výhody 3D buněčné kultury. Ve 3D buněčných systémech tvar buněk, interakce mezi nimi a prostředím lépe napodobují přirozené prostředí v těle (viz Obr. 2). Takové systémy neobsahují pouze proliferující buňky, ale také buňky v klidovém stádiu, apoptické, hypoxické, nekrotické. Mezi další výhody patří to, že 3D systémy lépe odrážejí normální diferenciaci, polarizaci, chování buněk a intercelulární interakce. [9]

2D-environment (adhesion)



3D-environment (migration)



Obr. 2 Porovnání migrace ve 2D a 3D prostředí. 2D příklad ukazuje principy mechanobiologie, pomocí které buňka čte (zelené šipky) mechanické vlastnosti ECM a převádí je na biochemický intracelulární signál (červená šipka), který ovlivňuje cytoskelet, signalizaci a transkripci. Nakonec buňka reaguje jak působením sil na samotný podklad (modrá šipka), tak aktivací procesů, jako je proliferace, apoptóza, diferenciace a migrace (velká modrá šipka). Situace je složitější u 3D migrace, ve které se buňky mohou pohybovat uvnitř ECM, složené z vláken (označené oranžově) různého složení, struktury, topologie a dalších nemigrujících buněk (označené červeně). V této složité situaci musí buňky integrovat signály vysílané různými typy fokálních adhezí a spojů. [10]

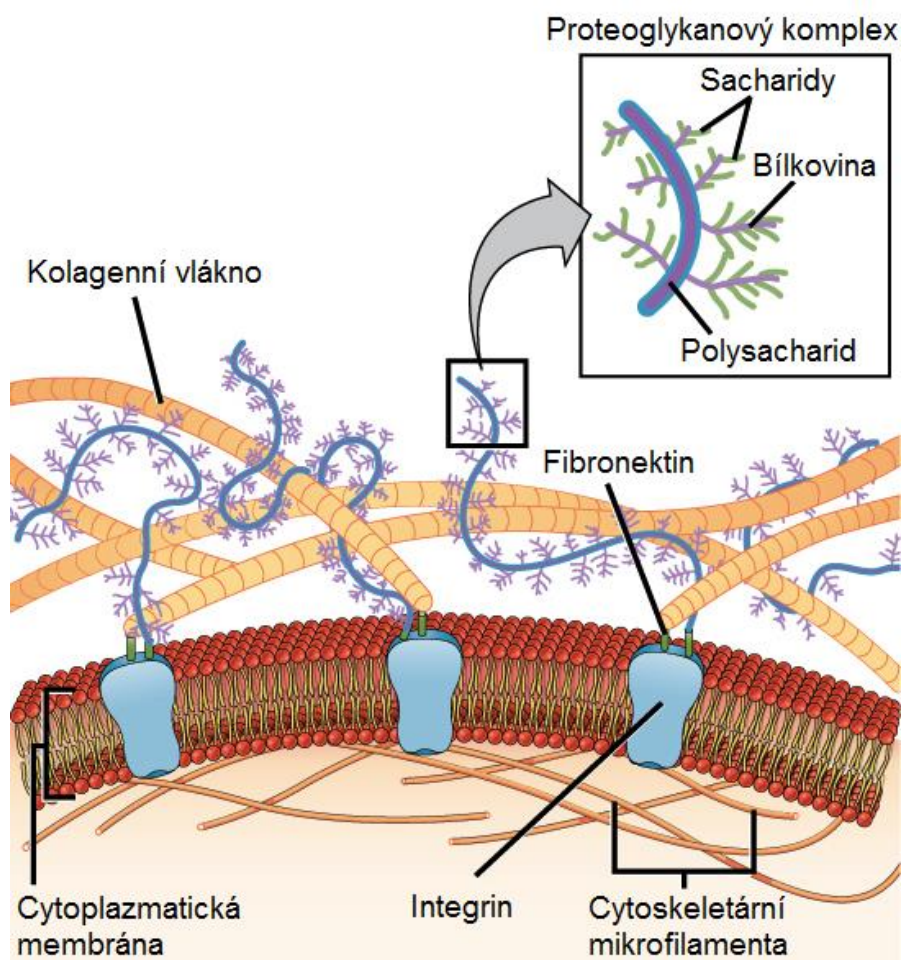
3D prostředí poskytuje okolní podporu pro buňky in vivo. U epitelálních buněk to umožňuje uspořádání buněk do polarizovaných epitelů a struktur vyšších řádů. U fibroblastů napravuje polarizaci buněk nanesených na 2D substrát, kde se buňky adherují pouze k povrchu substrátu. Naopak buňky ve 3D vykazují adhezi k matrix celým svým povrchem. Matice nejen fyzicky podporuje buňky, ale také poskytuje informace, které mohou určitým způsobem ovlivnit buněčnou diferenciaci. [11]

Malé G-proteiny (GTPázy) jsou známy jako regulátory směrovosti migrace. Rac1 je nejstudovanějším členem Rho/Rac rodiny, což je skupina malých GTPáz. Účinkuje především jako regulátor cytoskeletu. Buňky na 2D površích často spontánně mění svůj směr migrace; tyto změny jsou spojeny s relativně vysokou aktivitou Rac1. Buňky ve 3D prostředí jsou mnohem odolnější vůči změnám směru migrace a vykazují nižší úroveň aktivity Rac1. [11]

2.2 Extracelulární matrix

Mechanismy a regulace buněčné migrace byly rozsáhle studovány v dvourozměrných modelech buněčných kultur. Rozdíly mezi chováním buněk v kultuře a in vivo však vedly k přechodu na trojrozměrné modely, které lépe reprezentují mikroprostředí živých tkání. Při klasické dvourozměrné kultivaci buňky postrádají komponenty z trojrozměrné extracelulární matrix (ECM), která se vyskytuje in vivo. [12]

Extracelulární matrix (ECM) či mezibuněčná hmota je materiál ukládající se v mezibuněčných prostorech (viz Obr. 3). Skládá se z proteinů (zejména kolagen) a z glykosaminoglykanů a glykoproteinů (laminin, fibronectin). Velké množství extracelulární matrix produkují například fibroblasty, buňky vaziva. Část extracelulární matrix se vyskytuje v podobě tzv. bazálních lamin na bázi epitelů. U rostlin poněkud podobnou funkci zastává celulóza. [13] Buňky mají vazebná místa, receptory pro ECM sloužící k připojení buněk k ECM i k regulaci jejich aktivity. [14]



Obr. 3 Extracelulární matrix ve vztahu k buněčné membráně [15]

Extracelulární matrix je přímo spojena s okolními buňkami. Některé z klíčových konektorů jsou proteiny nazývané integriny, které jsou zabudovány do plazmatické membrány. Proteiny v extracelulární matrix, stejně jako molekuly fibronektinu, mohou působit jako můstky mezi integriny a dalšími proteiny extracelulární matrix, jako je kolagen. [15]

Na vnitřní straně membrány jsou integriny spojeny s cytoskeletem. Pomocí integrinů se buňky přichycují k extracelulární matrix. Mimo to se účastní některých signalizačních kaskád, při nichž se navázání ligandu na integrin přenáší do nitra buňky jako signál, který reguluje např. fosforylaci proteinů, genovou expresi, růst a smrt buněk a podobně. [15]

ECM je bezbarvá, transparentní, gelovitá substance, ve které jsou buňky a vlákna zality. Matrix dělíme na složku vláknitou a složku amorfni. Vláknitá složka ECM je složena z kolagenních a retikulárních vláken. Kolagenní vlákna jsou dlouhá 1–20 μm . K vlastnostem kolagenního vlákna patří pevnost a ohebnost. Mají tendence tvořit svazky.

Je známo asi 21 typů kolagenu, které se liší sekvencí a typem aminokyseliny v řetězci. K nejznámějším typům kolagenu patří kolagen I (nejrozšířenější v organismu), kolagen II, kolagen III a kolagen IV. Retikulární vlákna jsou tvořena kolagenem typu III. Vlákna jsou dlouhá 0,2–2 μm a jsou tvořena 45 nm fibrilami. Tvoří síť v orgánech. Elastická vlákna jsou tenčí než kolagenní vlákna. Mají délku 0,5–4 μm . Centrální protein tvoří elastin a okolní mikrofibrily. Jsou elastická, tvoří síť, anastomózují a větví se. Elasticita je zajištěna díky hydrofóbní vlastnosti. Jsou produkována fibroblasty. [14]

Amorfní složka ECM je tvořena převážně vodou a ionty. Najdeme zde také glykosaminoglykany (GAG), které tvoří velké nerozvětvené polysacharidové řetězce. Tyto řetězce jsou složeny z disacharidových jednotek a mají negativní náboj. GAG jsou vysoce hydrofilní a udržují architekturu ECM. Zabraňují její deformaci kompresními silami díky: kyselině hyaluronové, chondroitin sulfátu, dermatan sulfátu, heparan sulfátu a heparinu, keratan sulfátu a proteoglykanům. S výjimkou kyseliny hyaluronové se GAG kovalentně váží k proteinu a tvoří proteoglykany – velké molekuly schopné udržovat vysokou hydrataci ECM. Další část amorfní složky tvoří adhezní proteiny. Jako příklad můžeme uvést fibronectin, který je multifunkční glykoprotein a váže se k receptorům na povrchu buněk nebo laminin, který je sulfonovaný glykoprotein v bazální lamině. [14]

Právě vzájemné interakce buněk a složek ECM a signály z ní vycházející často ovlivňují buněčnou migraci, a proto vznikla potřeba vytvořit techniky studia migrace ve 3D modelu. Základem takového modelu je síť z molekul ECM často v podobě gelu. V zásadě jde o látky, které se používají i pro povrchovou úpravu při 2D testech. [12]

2.3 Požadavky na podklady pro 3D kultivaci buněk

Vzhledem k uvedeným účelům využití musí scaffold splňovat určité podmínky. Materiál musí mít specifickou strukturu a prostorové uspořádání molekul pro to, aby napomáhal v růstu 3D tkáně. Měla by být zajištěna dostatečná pórovitost pro rovnoměrnou proliferaci, migraci a růst buněk jak v prostoru scaffoldu, tak v čase. Propojení jednotlivých pórů je důležité pro výměnu tekutin, odvádění odpadních tekutin a vytváření nových tkání.

Důležitý parametr, definující možnost využití materiálu, je jeho biokompatibilita, kterou lze chápat jako schopnost materiálu vyvolat vhodnou biologickou odpověď pro danou aplikaci. Jedná se o kompatibilitu s živou tkání, nebo s živým systémem s tím, že materiál není toxický, škodlivý, nebo fyziologicky reaktivní. Buňky musí být schopné adherovat k danému materiálu, migrovat na povrch a postupně scaffoldem prorůstat

a proliferovat, ve speciálních případech i diferenciovat. [16]

Zásadním požadavkem je také biodegradabilita (rozložitelnost) materiálu, tedy jeho vstřebání okolní tkání tak, aby se předešlo potřebě odstranění. Aby byla zajištěna dokonalá substituce novou tkání, poměr rychlostí proliferace buněk a degradace materiálu by měl být v ideálním případě rovnoměrný. Produkty degradace polymeru nesmí být toxické. [17]

Je důležité, aby byl materiál neimunogenní. To znamená, že nesmí vyvolat žádnou nežádoucí reakci (zánětlivost, cytotoxicita, karcinogenita, mutagenita atd.). S dalším vývojem definice biomateriálu a jeho klinického využití došlo k novému porozumění, že by biomateriál měl fungovat s odpovídající reakcí hostitele, a přitom nevyvolávat žádné nežádoucí lokální nebo systémové účinky. [16]

2.4 Materiály pro tvorbu 3D podkladů

Materiály využívané pro tvorbu těchto podpůrných matic jsou obecně dvojího typu. V prvním případě se jedná o biologické polymery jako fibrin, kolagen, hydrogel, chitosan. V případě syntetických polymerů se může jednat např. o PLA (polylactic acid) — polymer kyseliny mléčné nebo podobné materiály jako jsou PGA (poly glycolic acid) — polyglykolová kyselina a PCL (polycaprolactone) — polykaprolaktonová kyselina. [17]

2.4.1 Kolagen

O využití kolagenu v biomedicině a tkáňovém inženýrství existuje řada studií. Fibrilární kolagen je nejhojnější složkou extracelulární matrix (ECM), která udržuje strukturu většiny intersticiálních tkání a orgánů, včetně kůže, střev a prsu. 3D fibrilární ECM modely zahrnují diskontinuální strukturu fibrilárního substrátu poskytující jak adhezivní substrát, tak sterickou bariéru pro pohybující se buňky, podobně jako intersticiální tkáň bohaté na kolagen *in vivo*. [18]

Hustota a prostorová distribuce trojrozměrné kolagenové architektury definují mechanické tkáňové vlastnosti, tj. tuhost a porozitu, které řídí buněčnou migraci nebo působí proti ní. Pro reprodukci pohybu intersticiálních buněk *in vitro* s vysokou věrností *in vivo* podmínkám se 3D kolagenové mřížky rekonstruují z extrahovaných kolagenových monomerů, což vede k opětovnému sestavení fibrilární sítě s definovanou porozitou a tuhostí. Kolagen, který se používá pro experimenty *in vitro*, je extrahován kyselinou nebo enzymem ze zvířecí tkáně. Vhodné je zejména použití rozpustných kolagenů, které lze vyrobit velice čisté, oddělením nežádoucích látek denaturací.

V kyselém prostředí (nízké pH) se vlákna disociují na rozpustné fibrily. Mezi kolagenovými vlákny se tvoří pouze vodíkové vazby, které dávají roztoku vysokou viskozitu. V prostředí s neutrálním pH se fibrily polymerují na vlákna. Tato polymerizace vytváří trojrozměrný kolagenový gel. Je bioaktivní a má vlastnosti podporující buněčnou adhezi. Nevýhodou kolagenu a všech proteinů získávaných ze zvířat je jejich potenciální imunogenita. [18] [19]

2.4.2 Fibronektin

Fibronektin (FN) je multifunkční glykoprotein extracelulární matrix. Pokud jde o množství, je fibronektin druhou nejhojnější molekulou lokalizovanou v ECM a je jednou z nejvíce studovaných. Je složen ze dvou téměř identických polypeptidů vázaných k disulfidům o molekulové hmotnosti 220 kDa. Fibronektin má ligandy, které vykazují schopnost vázat se na mnoho typů buněk a umožňuje použití v rámci technik buněčné kultivace. Obsahuje také několik funkčně a strukturálně odlišných domén, které se mohou vázat na kolagen, fibrinogen nebo fibrin, glykosaminoglykany, proteoglykany a heparin. Důležitým prvkem fibronektinu je motiv arginin-glycin-aspartát (RGD), což je tripeptid nezbytný pro buněčnou adhezi a konstrukci matrice fibronektinu. [20] [21]

Fibronektin je produkován celou řadou epitelových a mezenchymálních buněk *in vitro* včetně fibroblastů, chondrocytů, myoblastů, Schwannových buněk, makrofágů, hepatocytů a střevních epitelálních buněk. Fibronektin zvyšuje adhezi a šíření buněk, ovlivňuje cesty buněčné migrace *in vivo* i v kultuře, specificky stimuluje buněčnou proliferaci. Ukázalo se, že fibronektin také hraje roli v buněčné morfologii, cytoskeletální organizaci, fagocytóze, hemostáze, embryonální diferenciaci a hojení ran. [20] Studie ukázala, že přidání fibronektinu do buněk kultivovaných v kolagenových gelech vedlo ke zvýšení počtu buněk a stimulaci jejich motility. [22]

2.4.3 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová (HA) je přirozeně se vyskytující glykosaminoglykan (negativně nabitý, lineární, nesulfátovaný polysacharid). Protože je známo, že se tato látka v organismu převážně nachází jako sodná sůl, prosazuje se spíše označení hyaluronan či hyaluronát. HA se nachází primárně v extracelulární matrix, ale bylo také prokázáno, že se vyskytuje v intracelulárním prostředí. Biologické funkce HA zahrnují udržování elastoviskozity tekutých pojivových tkání, jako je kloubní synoviální tekutina a tekutina očního sklivce, kontrolu hydratace tkáně a transport vody. Reguluje buněčnou adhezi a pohyblivost a zprostředkovává buněčnou proliferaci a diferenciaci,

čímž se stává nejen strukturální složkou tkání, ale také aktivní signalizační molekulou. [23]

Jeho funkcí v těle je mimo jiné vazba vody a lubrikace pohyblivých částí těla (např. kloubů a svalů). Kyselina hyaluronová je jednou z nejvíce hydrofilních molekul v přírodě (pojme přibližně tisícinásobek vody k své hmotnosti). Jedinečná viskoelastická povaha HA spolu s její biokompatibilitou a neimunogenitou vede k použití v řadě klinických aplikací, včetně doplnění kloubní tekutiny při artritidě. kyselina hyaluronová zajišťuje optimální organizaci pojivové tkáně v místě hojení a regenerace chirurgických ran. V závislosti na aplikaci se používá HA v různých koncentracích a molekulových hmotnostech. Lze jí využít také pro modifikaci kultivačních povrchu. [23]

2.4.4 Hydrogel

Hydrogel se stal jedním z nejpopulárnějších materiálů pro trojrozměrnou kultivaci buněk. Obrovská všestrannost hydrogelových materiálů umožňuje navrhnout scaffold s předdefinovanými mechanickými vlastnostmi a také s požadovanou biofunkcí. 3D hydrogelové konstrukce se používají pro různé aplikace včetně tkáňového inženýrství, dodávání léčiva, testování cytotoxicity a screeningu léčiv. [24]

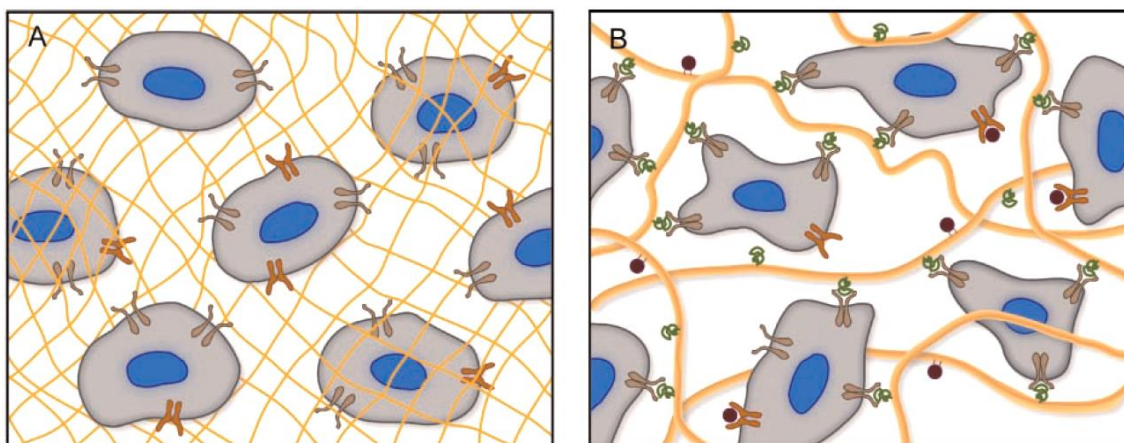
Hydrogely lze rozdělit do různých kategorií na základě uvažovaných molekulárních vlastností. Existují klasifikace založené na molekulárním náboji, strukturním složení, citlivosti na podněty, stupni degradace polymeru a jeho původu. Hydrogely lze také seskupovat podle oblasti použití. [24]

Hydrogely podle jejich původu se dělí do syntetických nebo polosyntetických (biohybridních) struktur. Mezi typické syntetické hydrogely patří polyethylenglykol (PEG), polyvinylalkohol (PVA), polyethylenoxid (PEO), polyakrylová kyselina (PAA), polyhydroxyethylmethakrylát (PHEMA), polykyselina methakrylová (PMMA). Tyto materiály kompenzují některé nevýhody přírodních materiálů, protože mohou být vyráběny v jednotné kvalitě, mají definovanou strukturu a viskoelasticitu. Výhodou syntetických hydrogelů jsou jejich mechanické vlastnosti, které mohou být přizpůsobeny konkrétní aplikaci. Hlavním omezením syntetických hydrogelů je to, že jejich vysoce opakující se a syntetické struktury neposkytují buňkám žádnou biologickou informaci (viz Obr. 4). [24]

Mechanické vlastnosti hydrogelu jsou také ovlivněny mírou degradace, ke které dochází během růstu a šíření buněk. Řízená degradace hydrogelu je nejdůležitější vlastností pro aplikace *in vivo*. Mezi základní degradační mechanismy patří disoluce,

hydrolýza a enzymatická degradace. Rychlost degradace by měla být pečlivě kontrolována, aby odpovídala schopnosti buněk šířit se, migrovat a syntetizovat vlastní komponenty ECM. Většina přírodních hydrogelů (např. ty, které jsou vyrobeny z fibrinu, kolagenu nebo kyseliny hyaluronové) je přirozeně degradována působením enzymů vylučovaných buňkami. Může však být požadována přesnější kontrola rychlosti degradace. Toho lze dosáhnout zavedením hydrolyticky degradovatelných zesílení do hydrogelů. Důležité příklady zahrnují PEG hydrogely modifikované segmenty kyseliny polyglykolové (PGA) nebo kyseliny polymléčné (PLA). Nespecifické rozpouštění hydrogelové sítě může být řízeno množstvím esterových vazeb zabudovaných do hlavní struktury hydrogelu. Vnější kontrola degradace může být také zavedena exogenním přidáním hydrolytických enzymů k hydrogelu nebo vytvořením fotodegradovatelných gelů. [24]

V současné době se vědci snaží zkombinovat to nejlepší ze světa syntetických hydrogelů a navrhnout nové polosyntetické nebo biohybridní hydrogely. Takové struktury typicky obsahují syntetický hydrofilní polymer, který je konjugován s polysacharidovou nebo proteinovou částí. Polosyntetické hydrogely se vyrábějí v kopolymerizačních reakcích mezi prekurzorem polymeru a biologickým konjugátem. Tímto způsobem je možné vytvořit hydrogel s vysoce definovanými technickými vlastnostmi, ale takový, který poskytuje biologické informace buňkám, např. čistý PEG je inertní vůči proteinům a buňkám, avšak modifikací s peptidovými sekvencemi bylo možné vytvořit hybridní strukturu, která vykazuje adhezi buněk. [24]



Obr. 4 Syntetický hydrogel (A) složený ze syntetických polymerů (žluté pletivo) poskytuje 3D prostředí pro kultivaci buněk; neumožňuje však aktivaci integrinů (označené červeně) a dalších povrchových receptorů (označené oranžově). Naopak biohybridní hydrogel (B) aktivuje vazebné místa integrinu (označené zeleně) a poskytuje růstové faktory, umožňuje komunikace buňky s ECM (žlutá vlákna), která řídí chování buněk prostřednictvím signálních kaskád. Podporuje tak proliferaci, růst, vývoj a migraci buněk. [25]

3 PRAKTICKÁ ČÁST

Cílem této práce je ověření kultivace buněk v buněčné laboratoři a návrh experimentu pro sledování migrace mezenchymálních kmenových buněk v extracelulární matrix s použitím konfokálního mikroskopu.

Jednotlivé cíle práce:

1. Kultivace buněčné linie MSC;
2. Barvení buněk zvolenými fluorescenčními barvivy;
3. Příprava kolagenového gelu pro simulaci 3D prostředí buněk;
4. Přidání buněk do kolagenového gelu;
5. Intervalové snímání buněk konfokálním mikroskopem;
6. Návrh algoritmu v programovém prostředí MATLAB;
7. Zpracování dat s následnou aplikací statistických testů na výběrové skupiny získaných hodnot;
8. Diskuze dosažených výsledků.

3.1 Použité přístroje a pomůcky

- Inkubátor – MEMMERT INCOmed
- Chladnička pro laboratorní účely – LIEBHERR Thermostatic cabinet
- Vodní lázeň – Julabo ED
- Laminární box – Alpina BIO 100
- Inverzní mikroskop – ZEISS Axio Observer 5
- Laboratorní centrifuga – Eppendorf MiniSpin
- Konfokální mikroskop – Leica TCS SP8 X

- Sterilní kultivační destičky – 24-jamkové, 8-jamkové
- Sterilní kultivační láhve – 25T
- Konfokální misky se skleněným tenkým dnem BIO-PORT Europe s.r.o.
- Plastové pipety – 3 ml
- Serologické sterilní pipety – 1 ml, 5 ml
- Nastavitelné pipety – HTL, Discovery comfort; 0,5–10 μ l, 20–200 μ l, 100–1000 μ l
- Pipetový dávkovač – Eppendorf Easypet
- Sterilní špičky pro dávkovače
- Plastové centrifugační zkumavky s uzavěrem

3.2 Kultivační médium a ostatní roztoky

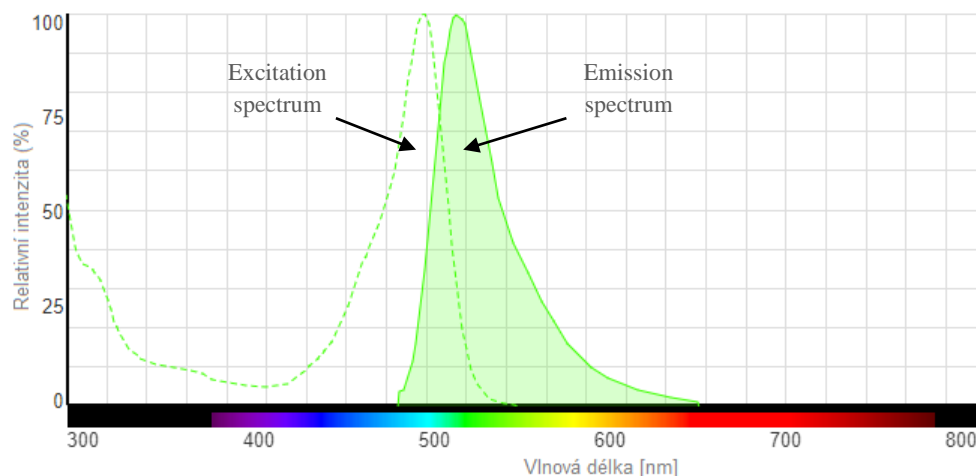
Níže je uveden seznam chemikálií, které byly použity v odborné laboratoři při ověřování vybraných experimentů:

- Dulbeccovo modifikované Eagleho médium – DMEM D2429 (s přídavkem 1000 mg/l glukózy, penicilinu, streptomycinu, L-glutaminu, pyrohroznanu sodného a hydrogenuhličitanu sodného; sterilní, vhodný pro buněčné kultury), Sigma-Aldrich
- Fosfátový pufovaný fyziologický roztok – PBS P4417-50TAB, Sigma-Aldrich
- Akutáza – Accutase-Solution, L11-007, PAA Cell Culture Company
- CellTracker™ Green CMFDA C7025, Invitrogen
- CellTracker™ Red CMTPX C34552, Invitrogen
- Kolagen – Collagen type I, Rat Tail, 50201, Ibidi
- Fibronektin - F4759 Fibronectin Bovine Plasma (powder, BioReagent, suitable for cell culture), Sigma-Aldrich
- Sterilní destilovaná voda
- NaOH (hydroxid sodný) – 1 M roztok
- NaHCO₃ (hydrogenuhličitan sodný) – 7,5 % roztok

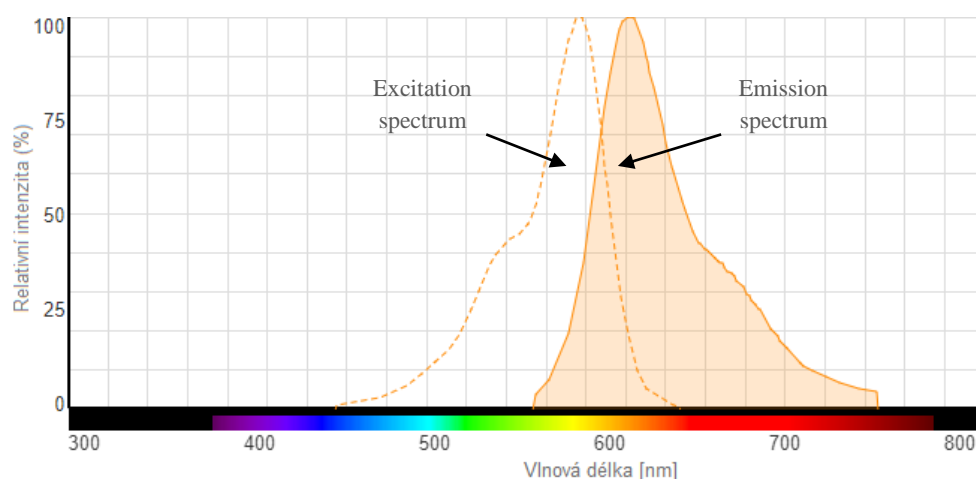
3.3 Přehled použitých fluorescenčních barviv

CellTracker™ Green CMFDA (5–chlormethylfluorescein diacetát) je fluorescenční barvivo vhodné pro sledování pohybu buněk. Pro detekci buněk MSC v gelu obarvených CellTracker™ Green CMFDA byla nastavena excitace laserového paprsku na hodnotu 490 nm, po ozáření tyto buňky emitují světlo v zeleném spektru (500–550 nm, viz Obr. 5).

Pro obarvení buněk MSC přidaných na povrch gelu bylo použito fluorescenční barvivo CellTracker™ Red CMTPX. Tmavě červená excitační/emisní spektra jsou ideální pro multiplexování se zelenými fluorescenčními barvivy. Pro detekci těchto buněk byla nastavena excitace na hodnotu 577 nm, po ozáření buňky emitují světlo v červeném spektru (587–637 nm, viz Obr. 6).



Obr. 5 Excitační a emisní spektrum CellTracker™ Green CMFDA [26]



Obr. 6 Excitační a emisní spektrum CellTracker™ Red CMTPX [26]

Výhody těchto komerčně dostupných barviv spočívají v jejich nízké cytotoxicitě a jednoduchosti použití. Obarvené buňky vykazují fluorescenci po dobu nejméně 72 hodin. Mezi další výhody jistě patří i to, že molekuly barviva snadno pronikají přes buněčnou membránu a dobře se udržují v buňkách, což umožňuje vícegenerační sledování buněčných pohybů. [27] [28]

3.4 Kultivace a pasážování buňčné linie MSC

Nastavené parametry inkubátoru pro inkubaci buněk:

- Teplota: 37 °C
- Koncentrace oxidu uhličitého (CO₂): 5 %
- Vlhkost vzduchu: 72 %

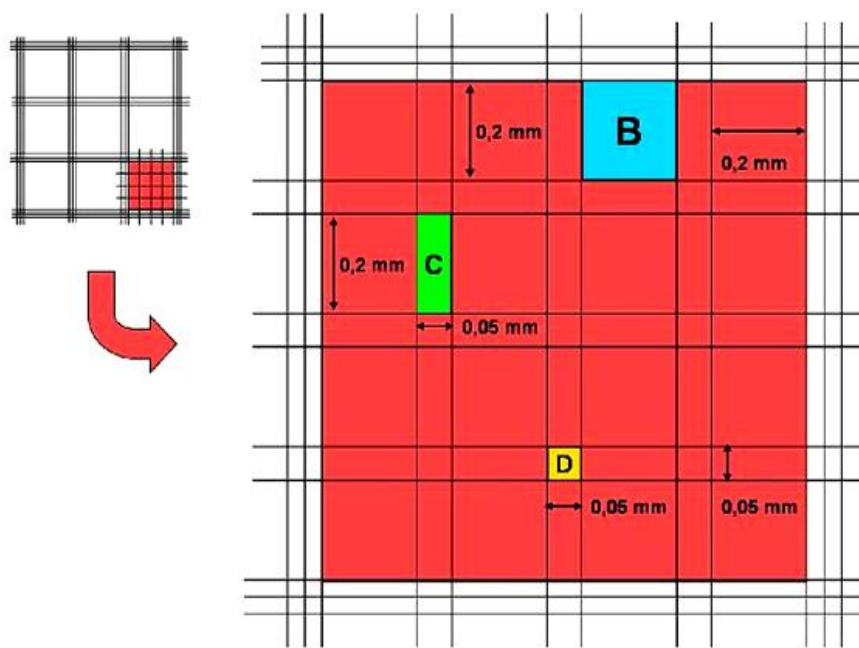
Pasážování buněk bylo prováděno po dosažení 70-80 % konfluence. Před vlastním pasážováním je třeba vyčistit etanolem povrchy v boxu a připravit vše potřebné: pomůcky (pipety, sterilní zkumavky, misky atd.), chemikálie a roztoky (médiu, PBS atd.), které je třeba zahřát ve vodní lázni na 37 °C. Vždy je potřeba všechny pomůcky postříkat etanolem, otřít a vložit do boxu.

Protokol pasážování buněk MSC, kultivovaných v láhvi (24-jamkové destičce) vypadá následovně:

1. Odsát staré médium z kultivační láhve (jamky).
2. Buňky opláchnout 2 ml (200 μ l) sterilním roztokem PBS.
3. Po odstranění PBS přidat do láhve (jamky) 1 ml (200 μ l) sterilního roztoku akutázy, láhev (jamku) dát do inkubátoru.
4. Po minutové inkubaci zkontrolovat buňky pod mikroskopem (zakulacení buněk, plavání v roztoku). Pokud to bude nutné, buňky jemně mechanicky sklepat ze dna kultivační nádoby.
5. Jakmile se buňky odlepi ode dna kultivační láhve (jamky), přidat do láhve (jamky) 3 ml (600 μ l) média (zastaví účinek akutázy).
6. Pipetováním (nejméně pětkrát) šetrně resuspendovat buňky.
7. Suspenzi buněk odsát a přelit do sterilní plastové centrifugační zkumavky.
8. Centrifugovat buňky (6 minut, 900 rpm).
9. Po centrifugaci odstranit pipetou supernatant z plastové zkumavky. Do ní poté přidat 1 ml média a pipetováním znovu resuspendovat buňky.
10. Spočítat koncentraci buněk v 1 μ l buněčné suspenze (postup je popsán níže).
11. Do nové kultivační láhve (jamky) přidat určité množství kultivačního média a určité množství buněčné suspenze.
12. Popsat láhev (jamku) – typ buněk, číslo pasáže, datum, jméno, koncentrace buněk. Buňky zkontrolovat pod mikroskopem a vložit do inkubátoru.

Na tomto místě se musíme ještě zmínit o koncentraci buněk v 1 μ l buněčné suspenze, získané z kultivační jamky po pasážování. Počítání buněk jsme prováděli pomocí Bürkerovy komůrky (viz Obr. 7).

Na této komůrce jsou vyryty dvě počítací mřížky. Každá z nich je rozdělena třemi čarami na 9 velkých čtvercových polí, jejichž strana měří 1 mm. Tato pole jsou tvořena středními čtverci o ploše 0,04 mm² a v jejich rozích jsou malé čtverce s plochou 0,0025 mm². Po stranách středních čtverců jsou obdélníky, jejichž plocha se rovná čtyřem malým čtvercům, tedy 0,01 mm². Přikrytím ploch s mřížkami krycím sklem vzniká prostor na počítání buněk vysoký 0,1 mm. [29]



Obr. 7 Bürkerova komůrka [30]

Počet buněk v 1 μl suspenze lze určit vzorcem (1):

$$b = \frac{n}{c \cdot v \cdot h} \cdot z \quad (1)$$

kde b je počet buněk v 1 μl suspenze, n je celkový počet napočítaných buněk, c je počet čtverců ve kterých se počítalo, v je plocha použitého čtverce ($0,0025 \text{ mm}^2$ nebo $0,04 \text{ mm}^2$), h je hloubka komůrky ($0,1 \text{ mm}$), z je použité ředění suspenze.

Pro rozlišení živých a mrtvých buněk se používá barvení trypanovou modří. Test je používán pro určení porušení strukturální integrity buněčné membrány. Barvivo nemůže vstoupit do buněk s neporušenou buněčnou membránou (živých buněk), proto tyto buňky zůstávají neobarvené. Postup spočívá v míchání buněčné suspenze s roztokem trypanové modří v poměru 1:1 (číslo ředění se v tomto případě rovná 2) s následným hodnocením poměru živých a mrtvých buněk.

V našem experimentu jsme počítali buňky ve velkých čtvercích o ploše $0,04 \text{ mm}^2$ a spočítali jsme 102 buněk v 16 čtvercích. Současně bylo provedeno barvení buněk trypanovou modří, proto číslo ředění suspenze se v našem případě rovná 2.

Aplikujeme tak vzorec a dostáváme:

$$b = \frac{102}{16 \cdot 0,04 \cdot 0,1} \cdot 2 \approx 3188 \text{ buněk}$$

3.5 Kultivace MSCs v kolagenovém gelu

Pro imitaci 3D prostředí extracelulární matrix byl v této práci použit vysoce kvalitní roztok kolagenu typu I ze šlachy ocasu krysy. Hlavní náplní experimentu bylo barvení buněk zvolenými fluorescenčními barvivými s následným přidáním buněk do předem připraveného kolagenového gelu, přičemž buňky obarvené CellTracker™ Green CMFDA se přidávaly do kolagenové směsi, zatímco buňky obarvené CellTracker™ Red CMTX se přidávaly na povrch již polymerizovaného gelu po jedné hodině inkubace. Byly testovány dvě různé koncentrace kolagenu v gelu, a to $1,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ a $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Protokoly barvení buněk a přípravy kolagenového gelu jsou uvedeny níže.

Prvním krokem experimentu bylo vždy fluorescenční značení buněk nakultivovaných ve dvou jamkách 24-jamkového pole (požadovaná míra konfluence buněk je 70-100%). Jedna jamka byla obarvena CellTracker™ Green CMFDA a druhá CellTracker™ Red CMTX. Po barvení buňky z první jamky byly zpasážovány.

Poté se připravoval kolagenový gel v objemu $150 \mu\text{l}$, do této směsi se přidávalo $25 \mu\text{l}$ suspenze buněk obarvených CellTracker™ Green CMFDA. Zatím tato suspenze buněk v kolagenovém gelu byla nasazena do konfokální misky s tenkým dnem o průměru 10 mm a přemístěna do inkubátoru na 1 hodinu .

Následně byly zpasážovány obarvené buňky z druhé jamky, které byly přidány na povrch kolagenového gelu po hodinové polymerizaci. Do misky se přidávalo 2 ml média a $25 \mu\text{l}$ buněk do středu misky nad povrchem gelu. Díky použití barviv s rozlišným excitačním a emisním spektrem se dá rozlišit od sebe buňky nasazené v kolagenovém gelu od nasazených na povrch gelu.

Poslední fází experimentu bylo pořízení mikroskopických snímků pomocí konfokálního mikroskopu Leica TCS SP8 X.

3.5.1 Protokol barvení buněk MSC fluorescenčními barvivými

1. V jedné sterilní zkumavce smíchat $1000 \mu\text{l}$ média bez přítomnosti séra a $1 \mu\text{l}$ zvoleného fluorescenčního barviva (buď CellTracker™ Green CMFDA, nebo CellTracker™ Red CMTX, finální koncentrace barviva je $0,001 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$).
2. Odsát staré médium ze jamky (v ní zůstanou adherované buňky).
3. Buňky opláchnout $200 \mu\text{l}$ sterilním roztokem PBS.
4. Po odstranění PBS přidat do jamky $500 \mu\text{l}$ směsi média s barvivem. Destičku dát do termostatu.
5. Po 15 minutové inkubaci v termostatu odsát médium z jamky.

6. Do této jamky s buňkami přidat 500 μl čerstvého média s přidavkem séra.

3.5.2 Protokol přípravy kolagenového gelu o koncentraci $1,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$

1. Nachystat led.
2. Do sterilní zkumavky přidat 10 μl média s přidavkem séra.
3. Následně přidat 2,5 μl studeného roztoku NaOH.
4. Poté přidat 2 μl roztoku NaHCO_3 .
5. Do zkumavky přidat 40,5 μl destilované vody.
6. Nakonec přidat 25 μl média s přidavkem séra.
7. Velmi opatrně přidat do zkumavky 45 μl kolagenu. Pomalu resuspendovat směs, zabránit vzniku vzduchových bublin.
8. Dát namíchaný roztok do ledu.
9. Na základě spočítané koncentrace buněk přidat 25 μl buněčné suspenze do zkumavky s kolagenovou směsí.
10. Kolagenovou směs s buňkami dát do ledu. Finální objem kolagenové směsi činí 150 μl .
11. Ochlazenou směs následně přemístit do konfokální misky nebo jamky.
Vyvarovat se vzniku vzduchových bublin při nalévání směsi do misky nebo jamky. Vzniklé bubliny je třeba odsát pipetou.
12. Konfokální misku dát do inkubátoru. Gel nechat polymerizovat asi 30-45 min.

3.5.3 Protokol přípravy kolagenového gelu o koncentraci $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$

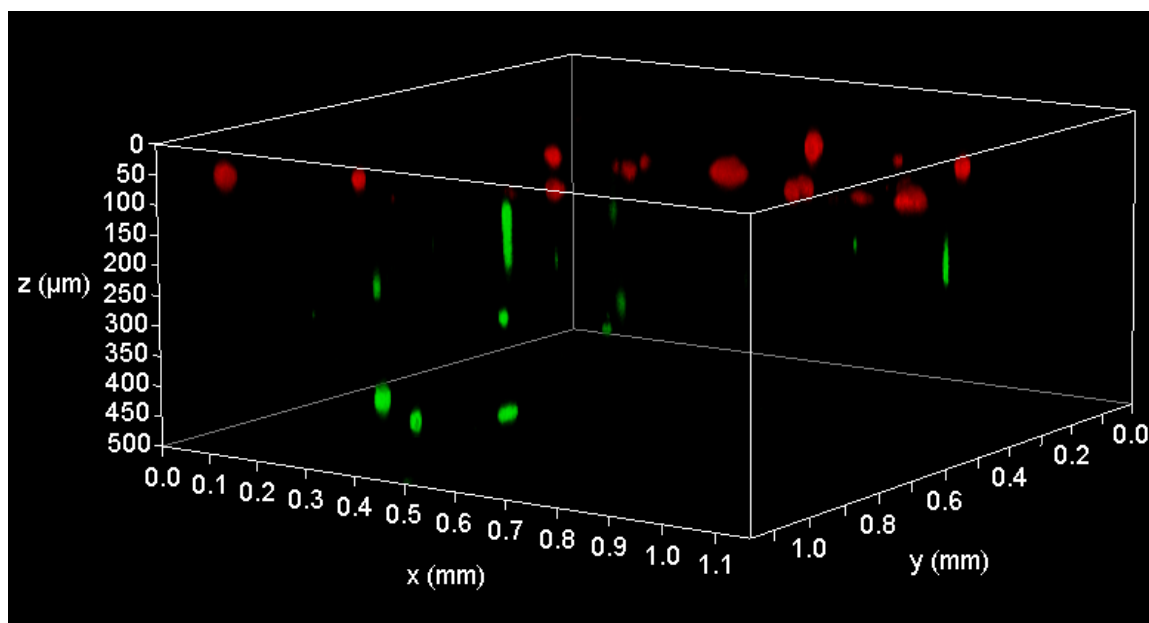
1. Nachystat led.
2. Do sterilní zkumavky přidat 10 μl média s přidavkem séra.
3. Následně přidat 2,5 μl studeného roztoku NaOH.
4. Poté přidat 1,5 μl roztoku NaHCO_3 .
5. Do zkumavky přidat 56 μl destilované vody.
6. Nakonec přidat 25 μl média s přidavkem séra.
7. Velmi opatrně přidat do zkumavky 30 μl kolagenu. Pomalu resuspendovat směs, zabránit vzniku vzduchových bublin.
8. Dát namíchaný roztok do ledu.
9. Na základě spočítané koncentrace buněk přidat 25 μl buněčné suspenze do zkumavky s kolagenovou směsí.
10. Kolagenovou směs s buňkami dát do ledu. Finální objem kolagenové směsi činí 150 μl .

11. Ochlazenou směs následně přemístit do konfokální misky nebo jamky.
Vyvarovat se vzniku vzduchových bublin při nalévání směsi do misky nebo jamky. Vzniklé bubliny je třeba odsát pipetou.
12. Konfokální misku dát do inkubátoru. Gel nechat polymerizovat asi 30-45 min.

3.5.4 Reprezentace pořízených dat

V rámci sběru dat bylo provedeno postupné skenování kolagenového gelu podél osy Z s možností 3D rekonstrukce získaných mikroskopických snímků. Pro rekonstrukci byl použit software LAS X, který je standartním programovým vybavením všech mikroskopů značky Leica Microsystems.

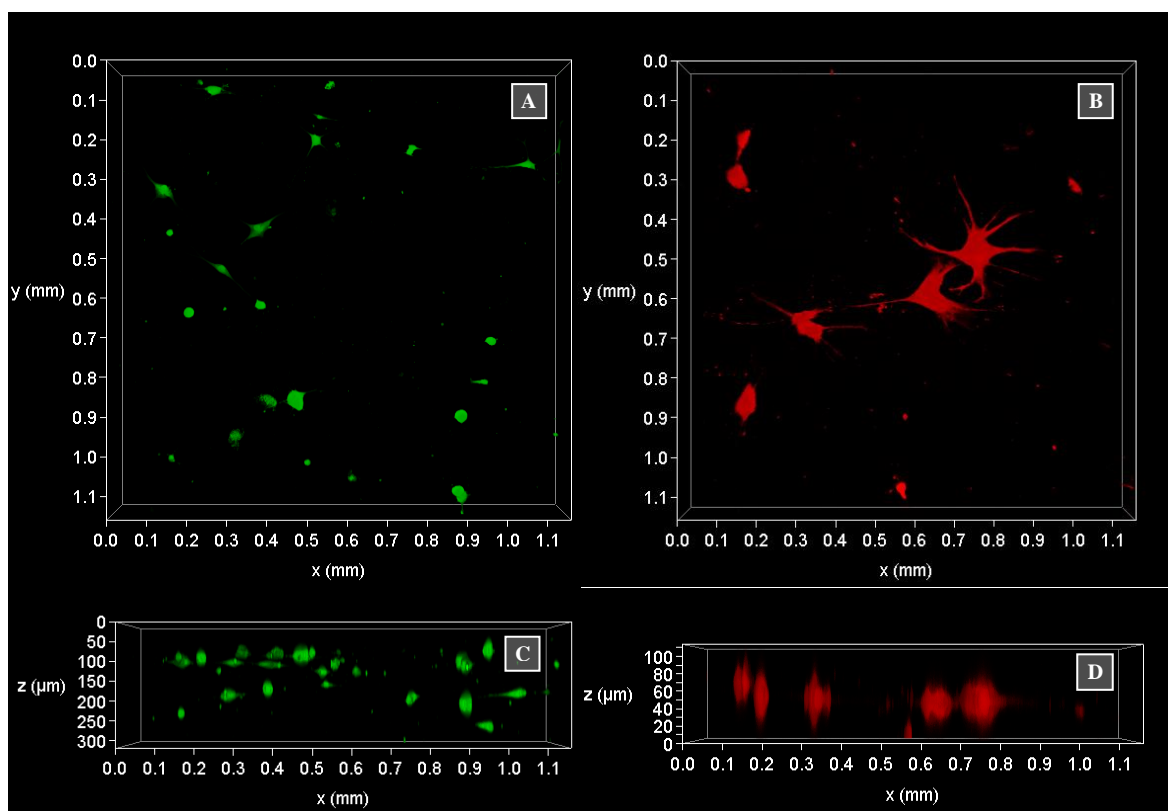
Na Obr. 8 – 10 je výsledná objemová reprezentace buněk MSC kultivovaných v kolagenovém gelu o koncentraci $1,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. První skenování bylo provedeno hned po přidání buněk obarvených CellTracker™ Red CMTX na povrch gelu (viz Obr. 8).



*Obr. 8 Rekonstrukce 3D buněčného prostředí po jedné hodině inkubace
(prostorové zobrazení, koncentrace kolagenu $1,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$).*

*Buňky obarvené CellTracker™ Green CMFDA jsou označeny zeleně, buňky obarvené
CellTracker™ Red CMTX jsou označeny červeně*

Další skenování v tomto experimentu bylo uskutečněno po 24 hodinách inkubace (viz Obr. 9). Pro zachycení buněk obarvených CellTracker™ Green CMFDA byl skenován gel o tloušťce 350 μm ode dna misky. Tyto buňky měly tendenci se trochu usadit, ale přesto zůstaly v prostorové struktuře gelu. Buňky obarvené CellTracker™ Red CMTPX adherovaly na povrch kolagenového gelu, který byl následně skenován.

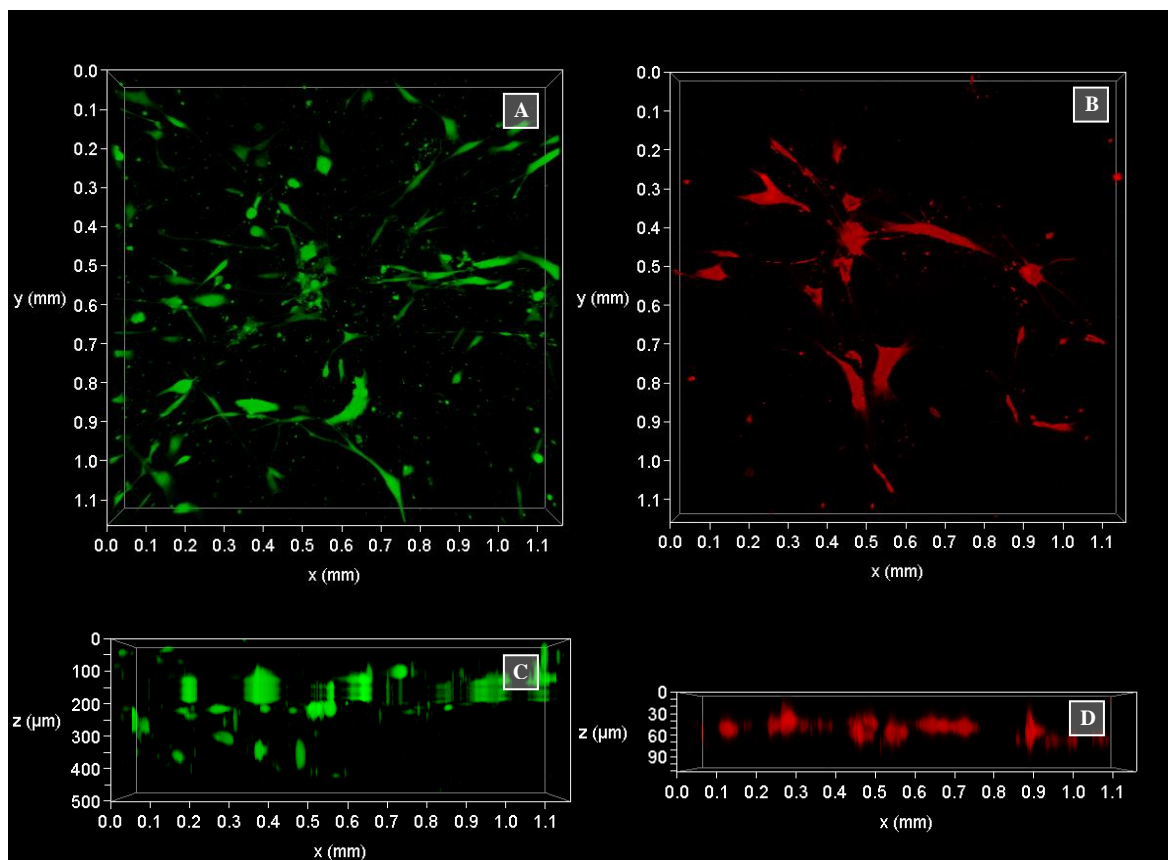


*Obr. 9 Rekonstrukce 3D buněčného prostředí po 24 hodinách inkubace
(koncentrace kolagenu $1,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$):*

- (A) buňky obarvené CellTracker™ Green CMFDA (pohled shora)*
- (B) buňky obarvené CellTracker™ Red CMTPX (pohled shora)*
- (C) buňky obarvené CellTracker™ Green CMFDA (pohled zepředu)*
- (D) buňky obarvené CellTracker™ Red CMTPX (pohled zepředu)*

Nakonec bylo provedeno skenování gelu po 96 hodinách inkubace. Výsledek rekonstrukce 3D buněčného prostředí můžeme pozorovat na Obr. 10.

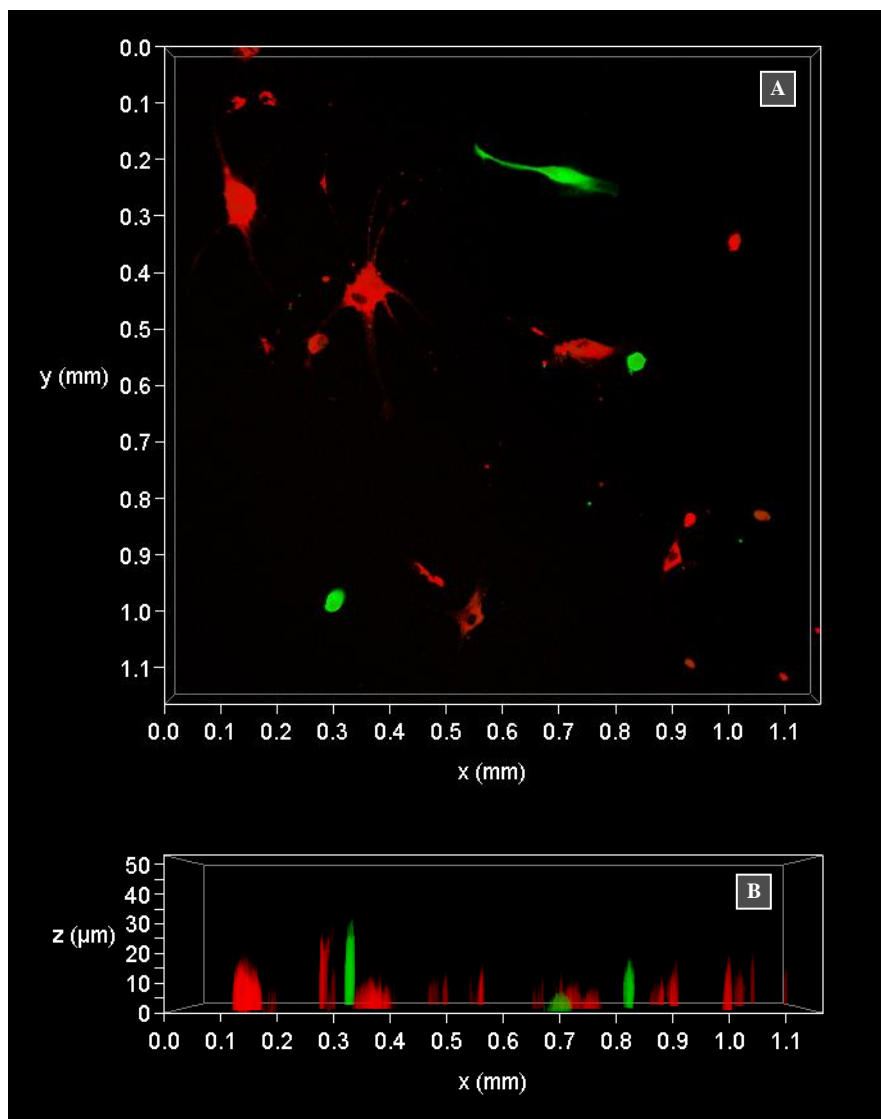
Je vidět, že došlo k proliferaci a růstu buněk kultivovaných v gelu a na jeho povrchu. Testovaná koncentrace kolagenu v gelu ($1,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) by byla vhodná pro tvorbu modelu migrace buněk přes endoteliální vrstvu do prostředí ECM. [31]



*Obr. 10 Rekonstrukce 3D buněčného prostředí po 96 hodinách inkubace
(koncentrace kolagenu $1,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$):*

- (A) buňky obarvené CellTracker™ Green CMFDA (pohled shora)*
- (B) buňky obarvené CellTracker™ Red CMTPX (pohled shora)*
- (C) buňky obarvené CellTracker™ Green CMFDA (pohled zepředu)*
- (D) buňky obarvené CellTracker™ Red CMTPX (pohled zepředu)*

Výsledek experimentu s využitím gelu o nižší koncentraci kolagenu ($1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) je zobrazen na Obr. 11. V tomto případě došlo k tomu, že buňky přidané do gelu se usadily na dně konfokální misky a adherovaly stejně jako buňky přidané na povrch gelu. Při této koncentraci kolagenu v gelu jsou buňky také schopné proliferovat.



Obr. 11 Reprezentace buněk MSC kultivovaných v kolagenovém gelu po 24 hodinách inkubace (koncentrace kolagenu $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$). Buňky obarvené CellTracker™ Green CMFDA jsou označeny zeleně, buňky obarvené CellTracker™ Red CMTPX jsou označeny červeně:

(A) pohled shora

(B) pohled zepředu

Při porovnání dvou experimentů jsme došli k závěru, že přidáním buněk do gelu byl zahájen proces jejich růstu a migrace v tomto 3D prostředí. Při kultivaci v hustším kolagenovém gelu jsou schopné buňky proliferovat, migrovat a adherovat v tloušťce

gelu stejně jako na jeho povrchu. Naopak při kultivaci buněk v gelu o koncentraci kolagenu $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ došlo k jejich sednutí na dno kultivační misky s následnou adhezí.

Úspěšnost experimentu potvrzuje teoretický předpoklad vhodnosti kolagenového gelu pro imitaci přirozeného prostředí. Během tohoto experimentu bylo zjištěno, že optické vlastnosti hustšího kolagenového gelu (koncentrace $1,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) ovlivňují výsledek měření z hlediska pořízení mikroskopických snímků. Na základě toho byla pro navržení vlastního experimentu ke studiu migrace buněk v ECM zvolena nižší koncentrace kolagenu v gelu, $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$.

3.6 Sledování migrace MSCs v kolagenovém gelu

Dalším cílem bylo zaměřit se na studium migrace buněk v umělé ECM. Pro umožnění kvantitativního hodnocení buněčné migrace byl proveden experiment s využitím gelu o menší koncentraci kolagenu ($1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) pro imitaci umělé ECM. Navíc byl tento experiment rozšířen o studium možného vlivu fibronektinu na buněčnou migraci. Byly zkoumány dvě různé koncentrace fibronektinu ($10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ a $50 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$). [22]

Pro tento experiment byly zvoleny 8-jamkové destičky (8 Well chambered cover Glass with #1.5 high performance cover glass, Cellvis). Toto řešení umožňuje sledovat nasazené buňky do různého typu ECM zároveň. V rámci jednoho experimentu byly vždy použity 4 jamky (rozměry jedné jamky $9,3 \times 8,7 \times 10,8 \text{ mm}^3$):

- Kontrolní jamka č. 1 obsahuje obarvené buňky kultivované v médiu;
- Jamka č. 2 obsahuje obarvené buňky kultivované v kolagenovém gelu;
- Jamka č. 3 obsahuje obarvené buňky kultivované v kolagenovém gelu s přidavkem roztoku fibronektinu o koncentraci $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$;
- Jamka č. 4 obsahuje obarvené buňky kultivované v kolagenovém gelu s přidavkem roztoku fibronektinu o koncentraci $50 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Stejně jako v předchozím případě spočívá první fáze experimentu v barvení buněk MSC fluorescenčním barvivem, konkrétně CellTracker™ Green CMFDA (protokol barvení viz 3.5.1). Druhá fáze experimentu zahrnuje přípravu kolagenového gelu (finální objem gelu $750 \text{ } \mu\text{l}$, po $250 \text{ } \mu\text{l}$ do jamek č. 2 – 4; protokol přípravy gelu viz 3.5.3).

Ve třetí fázi experimentu dochází k míchání kolagenového gelu s roztoky fibronektinu (protokol viz 3.6.1). Čtvrtá fáze experimentu zahrnuje pasážování buněk obarvených CellTracker™ Green CMFDA. Tyto buňky se pak přidávají do kontrolní jamky a na povrch gelu v ostatních jamkách. Následně kultivační destička se přemísťuje do inkubátoru na 4 hodiny.

3.6.1 Protokol přidání fibronektinu do kolagenového gelu

1. V jedné sterilní zkumavce smíchat 250 μl kolagenové směsi a 100 μl roztoku fibronektinu ($10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).
2. Přidat 250 μl této směsi do jamky č. 3.
3. V další sterilní zkumavce smíchat 250 μl kolagenové směsi a 100 μl roztoku fibronektinu ($50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).
4. Přidat 250 μl připravené směsi do jamky č. 4.
5. Dát 8-jamkovou destičku do inkubátoru. Gel nechat polymerizovat 60 min.

3.6.2 Reprezentace pořízených dat

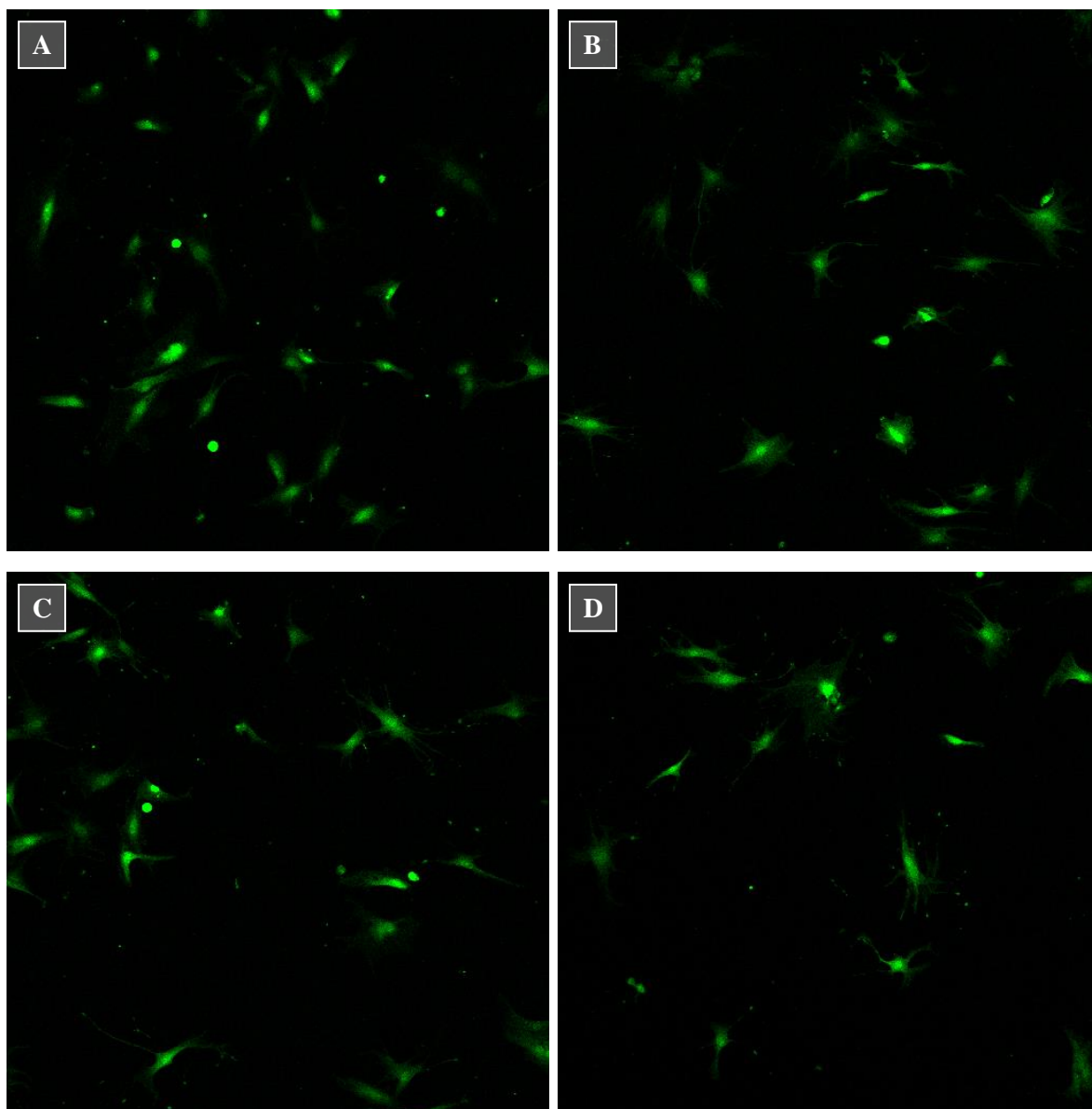
Po čtyřech hodinách inkubace buňky se přemísťují do inkubátoru konfokálního mikroskopu (The Stage Top Chamber, OKOLAB). Po dalších třiceti minutách probíhalo nastavení parametrů dlouhodobého skenování. V každé jamce bylo vybráno a nastaveno pro skenování 5 zorných polí. Takovým způsobem byly získány snímky z 20 zorných polí. Snímání buněk trvalo 16 hodin 30 minut s intervalem 15 minut. Pro každé zorné pole byla získána sekvence 67 snímků.

Dlouhodobé skenování bylo zahájeno po 5 hodinách inkubace buněk v kolagenu. Důležité parametry tohoto měření jsou uvedeny v Tab. 1. Obsahuje také informace o průměrné hustotě buněk v pozorovaném zorném poli, která je ve všech měřeních odlišná.

Reprezentace výsledných snímků buněk MSC po 16 hodinách inkubace je na Obr. 12.

Tab. 1 Parametry měření

Parametr	Hodnota		
	I. měření	II. měření	III. měření
Zahájení snímání	pět hodin po přidání buněk do jamek		
Interval snímání	15 minut		
Celková doba snímání	16 hodin 30 minut		
Počet snímků pro jedno zorné pole	67		
Velikost snímku (v pixelech)	512x512		
Počet polí pro jednu jamku	5		
Celkový počet snímků	1340		
Počet analyzovaných buněk v každé skupině	30		
Průměrná hustota buněk v pozorovaném zorném poli [buněk/pole]	15	20	25



*Obr. 12 Snímky buněk MSC po 16 hodinách inkubace:
 (A) v médiu (kontrolní skupina) (B) v kolagenovém gelu
 (C) v kolagenovém gelu s přidavkem fibronektinu ($10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)
 (D) v kolagenovém gelu s přidavkem fibronektinu ($50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)*

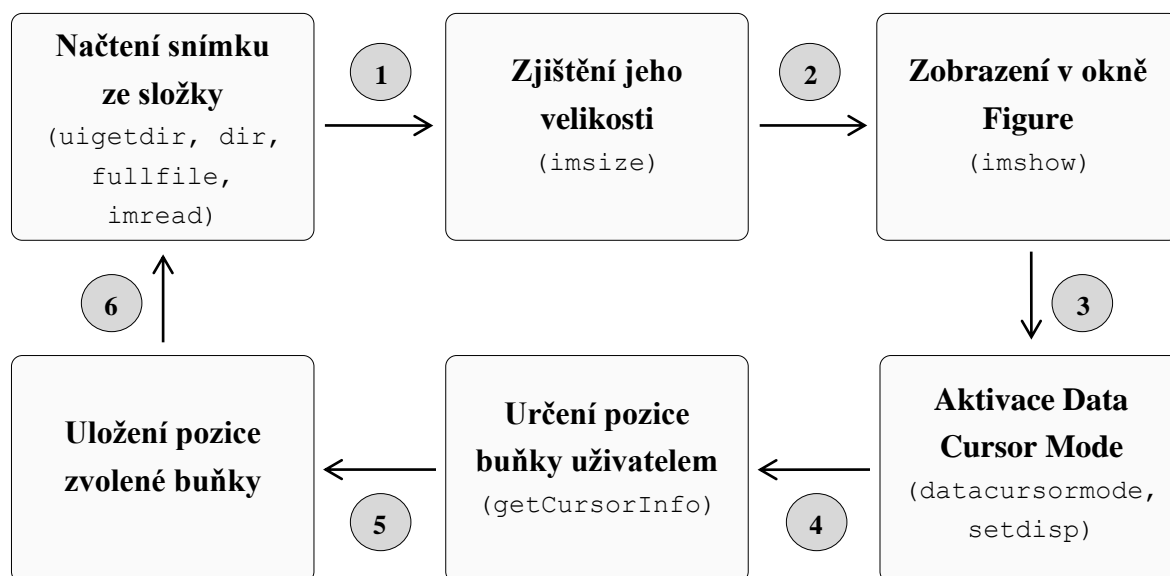
4 ZPRACOVÁNÍ DAT

Cílem zpracování obrazů získaných z experimentu je určit potřebné parametry migrace, jako jsou celková uražená vzdálenost, čistá vzdálenost a rychlost pohybu buněk. Na základě těchto parametrů bude provedeno porovnání čtyř testovaných skupin a vyhodnocení výsledků experimentů.

4.1 Popis algoritmu navrženého v programovém prostředí MATLAB

Za účelem analýzy nasnímaných obrazů byl navržen algoritmus v programovém prostředí MATLAB (verze R2020a). Základem algoritmu je trasování jednotlivých buněk s následným vykreslením tras pohybu buněk (směrová růžice, nebo rose plot). Algoritmus umožňuje také hodnocení rychlostí pohybu buněk.

Kostru algoritmu tvoří základní cyklus, který je znázorněn na Obr. 13.

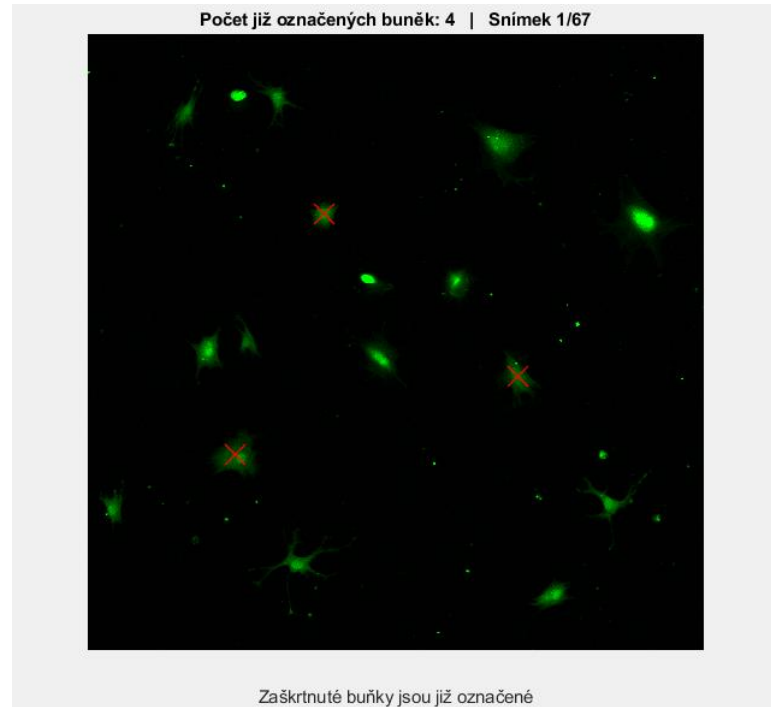


Obr. 13 Schéma navrhovaného algoritmu (*celltrack.m*)

Tento cyklus se bude opakovat, dokud nebudou postupně otevřeny všechny snímky ve složce a dokud nebude určena pozice zvolené buňky na všech snímcích. V průběhu cyklu se plní proměnná *coordinates*, která obsahuje informace o pohybu buněk.

Ve chvíli, kdy dojde k označení buňky na posledním snímku, se otevře dialogové okno. Pomocí tohoto okna si uživatel zvolí, zda chce pokračovat v označení buněk nebo ne. V případě kladné odpovědi se znovu otevře první snímek ve složce, na kterém

budou zaškrtnuty již označené buňky (viz Obr. 14).



Obr. 14 Ukázka běhu funkce *celltrack.m* (červeně jsou označeny již sledované buňky)

Po označení všech zájmových buněk následuje analýza získaných dat. Prvním krokem je centrování tras (pohyb všech buněk bude začínat v bodě (0,0)). Na základě velikostí zpracovávaných snímků se pak souřadnice přepočítají z pixelů na mikrometry (pro konfokální mikroskop Leica TCS SP8 X platí velikost pixelu 2,275 μm pro snímek 512x512 pixelů a 1,136 μm pro snímek 1024x1024 pixelů). Přepočtené souřadnice pohybu buněk jsou základem pro tvorbu tzv. směrové růžice, která je jedním z výstupů funkce (viz Obr. 16).

Ze získaných dat lze vyhodnotit celkovou uraženou vzdálenost d_{total} mezi počátečním a konečným bodem, vypočtenou pomocí Euklidovy metriky:

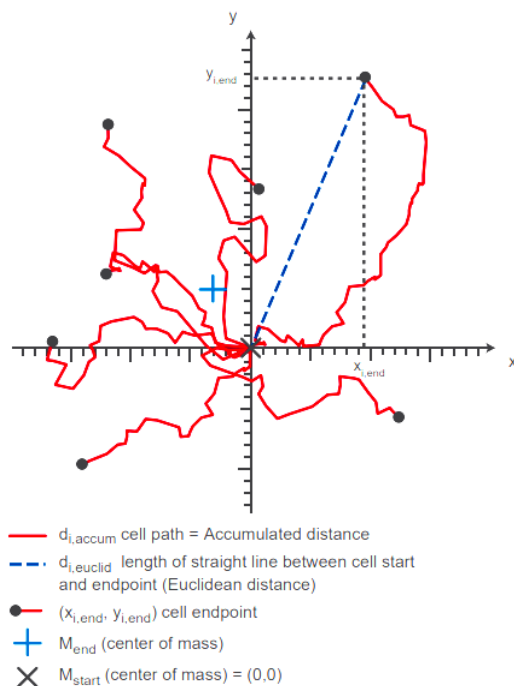
$$d_{total} = \sum_{i=1}^{n-1} \sqrt{(x_i - x_{i+1})^2 + (y_i - y_{i+1})^2} \quad (2)$$

kde x_i a y_i značí souřadnice buňky na i -tém snímku, x_{i+1} a y_{i+1} značí souřadnice téže buňky na $(i+1)$ -tém snímku, n značí celkový počet snímků ve složce.

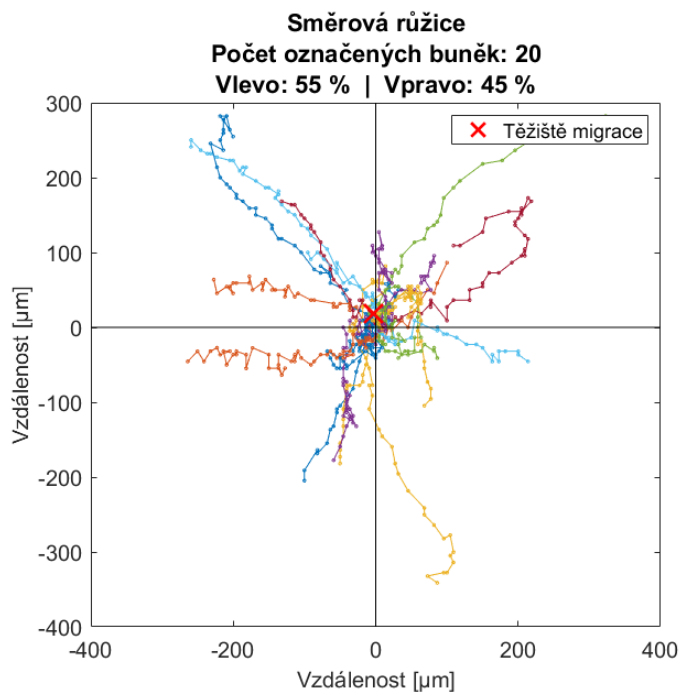
Dalším parametrem migrace je tzv. čistá vzdálenost (v anglické literatuře také *net distance* nebo *Euclidean distance*), kterou buňka prošla během experimentu. Je to vzdálenost mezi počáteční a konečnou polohou buňky na začátku a na konci experimentu:

$$d_{net} = \sqrt{(x_{end} - x_{ini})^2 + (y_{end} - y_{ini})^2} \quad (3)$$

Na Obr. 15 je znázorněn rozdíl mezi celkovou a čistou (Euklidovou) vzdáleností.

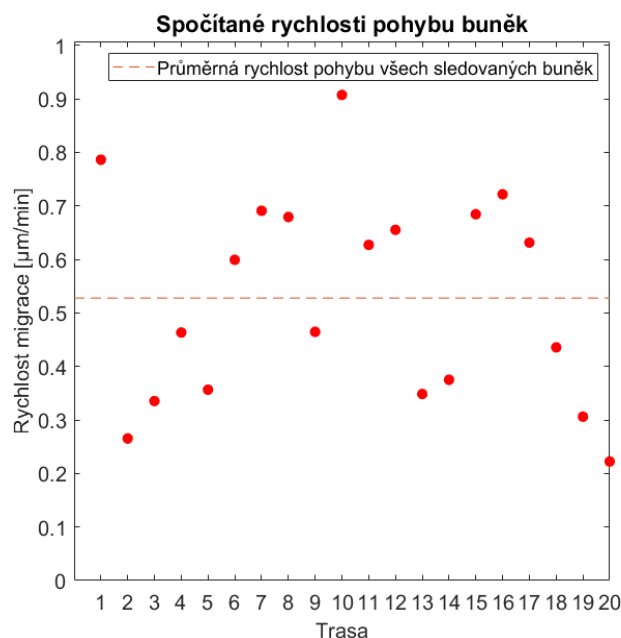


Obr. 15 Znáznornění celkové uražené vzdálenosti a Euklidovy vzdálenosti: $d_{i,accum}$ značí celkovou uraženou vzdálenost, $d_{i,euklid}$ je Euklidova vzdálenost, černým puntíkem je označen konečný bod migrace (cell endpoint), M_{end} je těžiště migrace, M_{start} je počátečný bod migrace [32]



Obr. 16 Ukázka směrové růžice pro 20 sledovaných buněk

Znalost časového intervalu snímání obrazů umožňuje vypočítat průměrnou rychlost pohybu jednotlivých buněk v experimentu a také průměrnou rychlost pohybu všech sledovaných buněk v daném experimentu (viz Obr. 17).



Obr. 17 Spočítané rychlosti pohybu jednotlivých buněk (průměrná rychlost pohybu všech sledovaných buněk je označena čárkovanou čarou)

4.2 Použití algoritmu pro kvantitativní analýzu experimentálních dat

Navržený algoritmus byl použit za účelem hodnocení migrace buněk MSC v umělém 3D prostředí. Byla provedena tři nezávislá měření s použitým gelem o koncentraci kolagenu $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ (postup je uveden v Kap. 3.6).

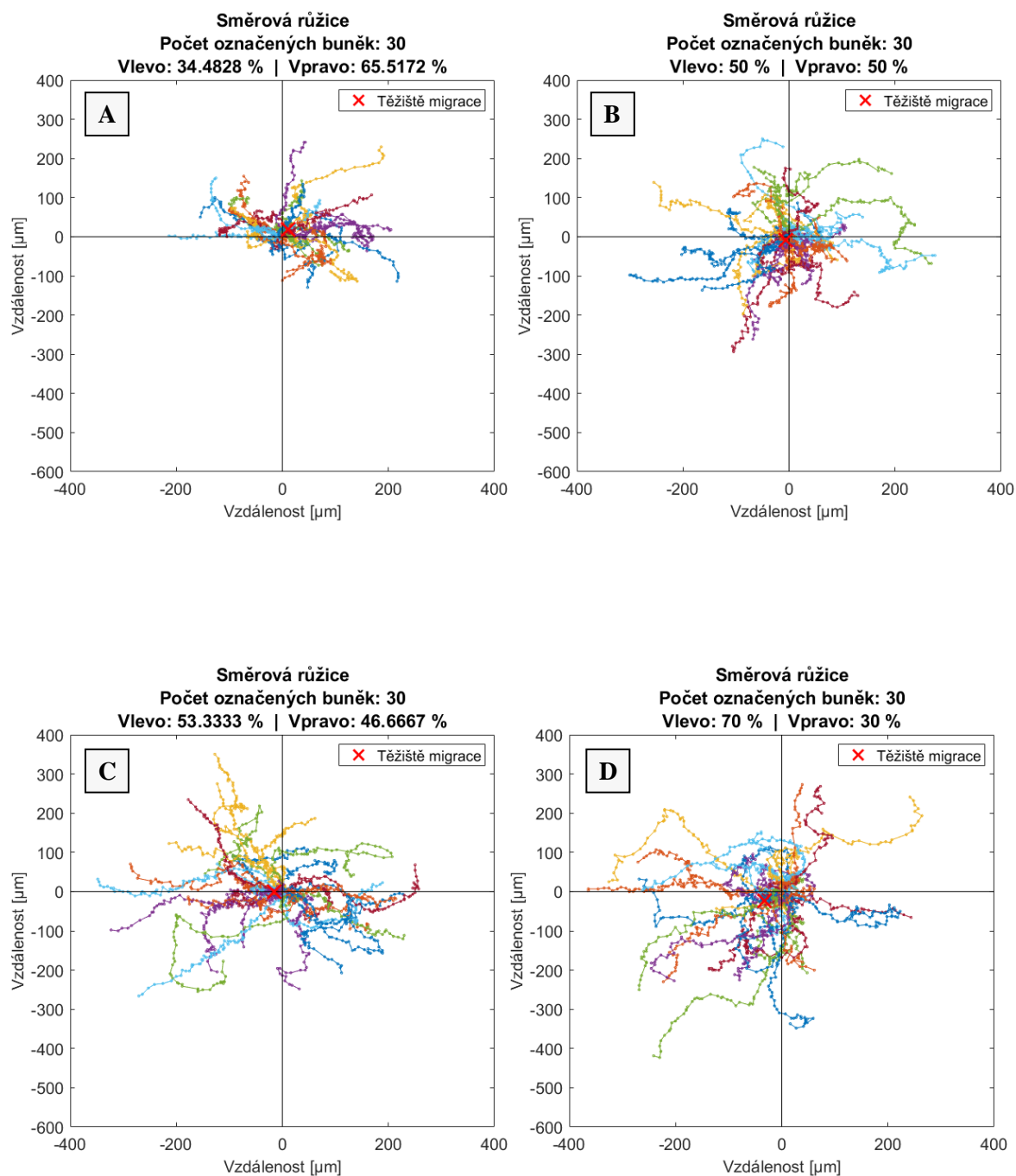
Princip každého měření spočíval v dlouhodobém snímání čtyř jamek, které tvořily čtyři experimentální skupiny. Snímání bylo zahájeno vždy pět hodin po přidání buněk do jamek. Jak již bylo řečeno, v každé experimentální jamce se vybíralo 5 polí. Celkem v každém měření bylo získáno 1340 snímků.

Po aplikaci navrženého algoritmu na mikroskopické snímky byly získány číselné hodnoty, které jsme zanesli do tabulek (viz Tab. 2, Tab. 3, Tab. 4, Tab. 11). Jedná se o hodnoty délek tras jednotlivých buněk (celkové, Euklidovy (čisté)) a rychlost jejich migrace. Z každé skupiny bylo náhodně vybráno 30 buněk, které se vždy vybíraly z prostřední části snímku. Pro každé měření jsme také zobrazili směrovou růžici (pro každou kontrolní skupinu zvlášť, viz Obr. 18 - 20).

4.2.1 I. měření

Tab. 2 Tabulka celkových vzdáleností a rychlostí migrace v prvním měření

Buňka	Celková uražená vzdálenost d_{total} [μm]				Průměrná rychlost pohybu v [$\mu\text{m}/\text{min}$]			
	Kontrola	Kolagen	Kolagen/ fibronectin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	Kolagen/ fibronectin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	Kontrola	Kolagen	Kolagen/ fibronectin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	Kolagen/ fibronectin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
1	476,64	538,23	530,42	670,65	0,48	0,54	0,54	0,68
2	325,76	482,55	409,44	565,92	0,33	0,49	0,41	0,57
3	429,60	475,35	522,22	684,26	0,43	0,48	0,53	0,69
4	459,76	422,83	543,98	613,62	0,46	0,43	0,55	0,62
5	319,30	606,57	678,09	626,40	0,32	0,61	0,68	0,63
6	342,15	670,60	655,81	649,47	0,35	0,68	0,66	0,66
7	374,30	432,41	445,73	648,01	0,38	0,44	0,45	0,65
8	382,50	400,25	485,66	681,55	0,39	0,40	0,49	0,69
9	280,43	347,87	570,66	645,45	0,28	0,35	0,58	0,65
10	468,36	484,73	475,19	641,45	0,47	0,49	0,48	0,65
11	492,59	576,54	588,15	629,15	0,50	0,58	0,59	0,64
12	334,46	578,91	509,02	581,48	0,34	0,58	0,51	0,59
13	377,32	542,79	496,51	736,54	0,38	0,55	0,50	0,74
14	410,23	492,67	542,05	621,36	0,41	0,50	0,55	0,63
15	406,59	488,12	529,03	677,40	0,41	0,49	0,53	0,68
16	390,36	435,46	564,71	615,38	0,39	0,44	0,57	0,62
17	387,30	702,68	628,48	609,05	0,39	0,71	0,63	0,62
18	345,82	541,67	591,21	540,54	0,35	0,55	0,60	0,55
19	364,38	524,87	607,90	695,98	0,37	0,53	0,61	0,70
20	313,57	603,20	586,60	547,20	0,32	0,61	0,59	0,55
21	357,36	445,30	571,94	532,71	0,36	0,45	0,58	0,54
22	502,55	538,84	580,56	615,19	0,51	0,54	0,59	0,62
23	465,08	488,97	669,16	630,94	0,47	0,49	0,68	0,64
24	398,62	526,89	436,80	663,92	0,40	0,53	0,44	0,67
25	392,56	471,79	512,94	639,05	0,40	0,48	0,52	0,65
26	382,90	477,45	710,25	619,57	0,39	0,48	0,72	0,63
27	327,86	556,19	526,21	501,87	0,33	0,56	0,53	0,51
28	416,96	464,41	421,97	570,04	0,42	0,47	0,43	0,58
29	210,59	463,14	588,71	588,10	0,21	0,47	0,59	0,59
30	466,49	445,81	456,22	644,35	0,47	0,45	0,46	0,65
μ	386,75	507,57	547,85	622,89	0,39	0,51	0,55	0,63



Obr. 18 Směrová růžice pro I. měření:

(A) kontrolní skupina

(B) kolagenový gel

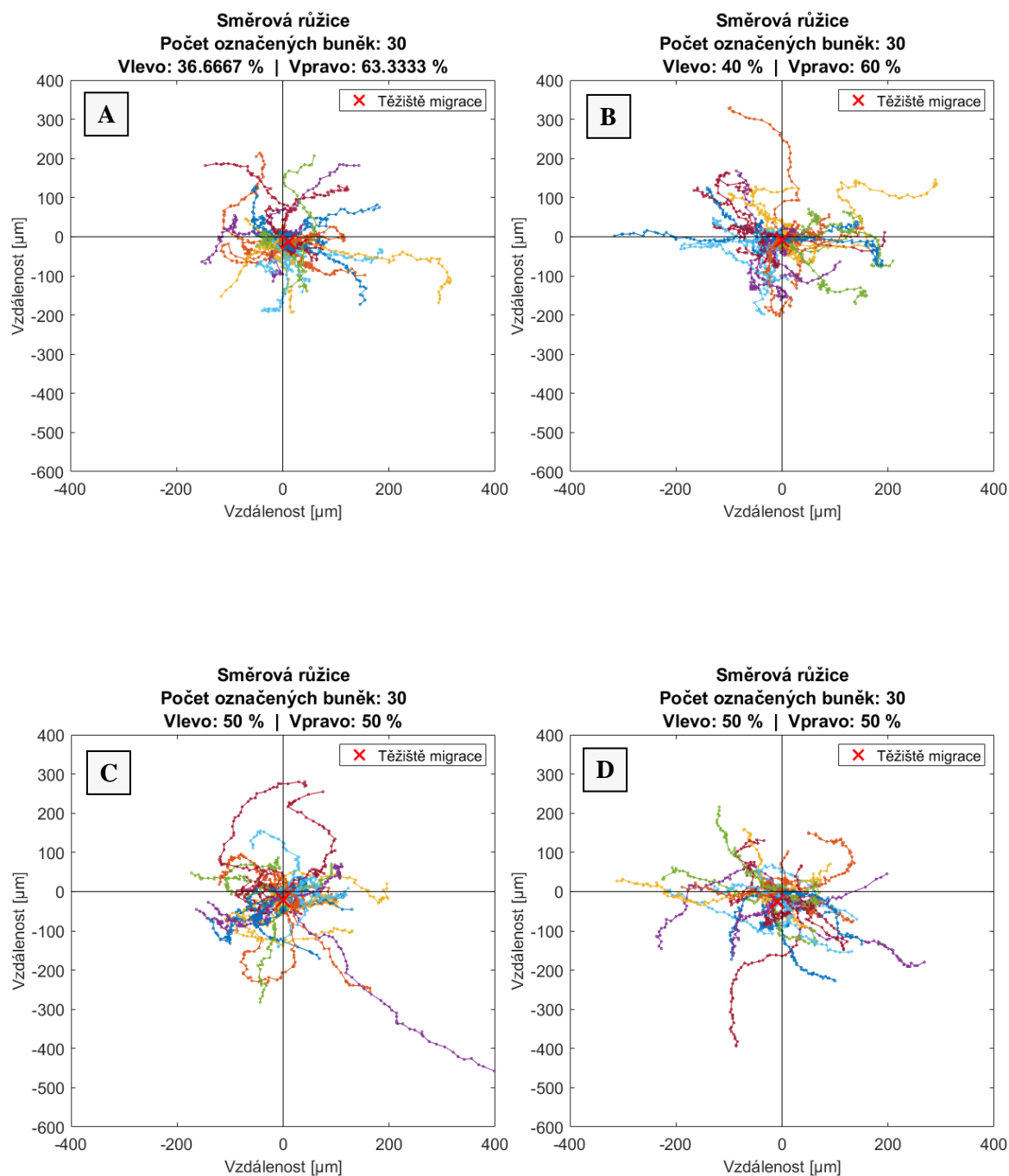
(C) kolagenový gel/fibronektin ($10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)

(D) kolagenový gel/fibronektin ($50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)

4.2.2 II. měření

Tab. 3 Tabulka celkových vzdáleností a rychlostí migrace v druhém měření

Buňka	Celková uražená vzdálenost d_{total} [μm]				Průměrná rychlost pohybu v [$\mu\text{m}/\text{min}$]			
	Kontrola	Kolagen	Kolagen/ fibronectin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	Kolagen/ fibronectin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	Kontrola	Kolagen	Kolagen/ fibronectin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	Kolagen/ fibronectin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
1	505,92	394,91	461,02	367,53	0,51	0,40	0,47	0,37
2	449,87	629,09	529,33	424,98	0,45	0,64	0,53	0,43
3	491,41	446,88	528,69	378,73	0,50	0,45	0,53	0,38
4	369,51	583,09	471,86	484,20	0,37	0,59	0,48	0,49
5	423,59	666,41	380,04	536,08	0,43	0,67	0,38	0,54
6	386,53	532,57	418,70	457,66	0,39	0,54	0,42	0,46
7	432,26	448,04	460,63	532,94	0,44	0,45	0,47	0,54
8	419,39	527,80	430,34	380,41	0,42	0,53	0,43	0,38
9	392,55	482,27	543,70	432,05	0,40	0,49	0,55	0,44
10	355,04	518,66	468,18	406,94	0,36	0,52	0,47	0,41
11	472,86	427,64	735,62	510,26	0,48	0,43	0,74	0,52
12	490,40	451,07	470,00	394,15	0,50	0,46	0,47	0,40
13	457,24	531,49	546,90	528,58	0,46	0,54	0,55	0,53
14	534,08	659,34	568,30	565,22	0,54	0,67	0,57	0,57
15	488,97	458,87	496,52	516,64	0,49	0,46	0,50	0,52
16	526,74	470,46	385,60	453,28	0,53	0,48	0,39	0,46
17	565,10	687,88	470,20	609,91	0,57	0,69	0,47	0,62
18	419,60	468,27	379,25	550,14	0,42	0,47	0,38	0,56
19	485,09	424,68	551,94	573,30	0,49	0,43	0,56	0,58
20	484,18	499,12	434,23	534,11	0,49	0,50	0,44	0,54
21	451,20	618,34	664,88	559,62	0,46	0,62	0,67	0,57
22	450,36	423,85	539,64	417,22	0,45	0,43	0,55	0,42
23	452,21	507,65	568,56	450,16	0,46	0,51	0,57	0,45
24	468,23	494,08	643,46	500,63	0,47	0,50	0,65	0,51
25	408,77	497,02	459,94	428,06	0,41	0,50	0,46	0,43
26	495,31	511,93	422,72	494,61	0,50	0,52	0,43	0,50
27	426,65	522,11	424,28	363,97	0,43	0,53	0,43	0,37
28	394,83	539,60	577,85	461,98	0,40	0,55	0,58	0,47
29	360,40	557,09	497,65	502,81	0,36	0,56	0,50	0,51
30	479,56	539,87	463,09	388,87	0,48	0,55	0,47	0,39
μ	451,26	517,34	499,77	473,50	0,46	0,52	0,50	0,48



Obr. 19 Směrová růžice pro II. měření:

(A) kontrolní skupina

(B) kolagenový gel

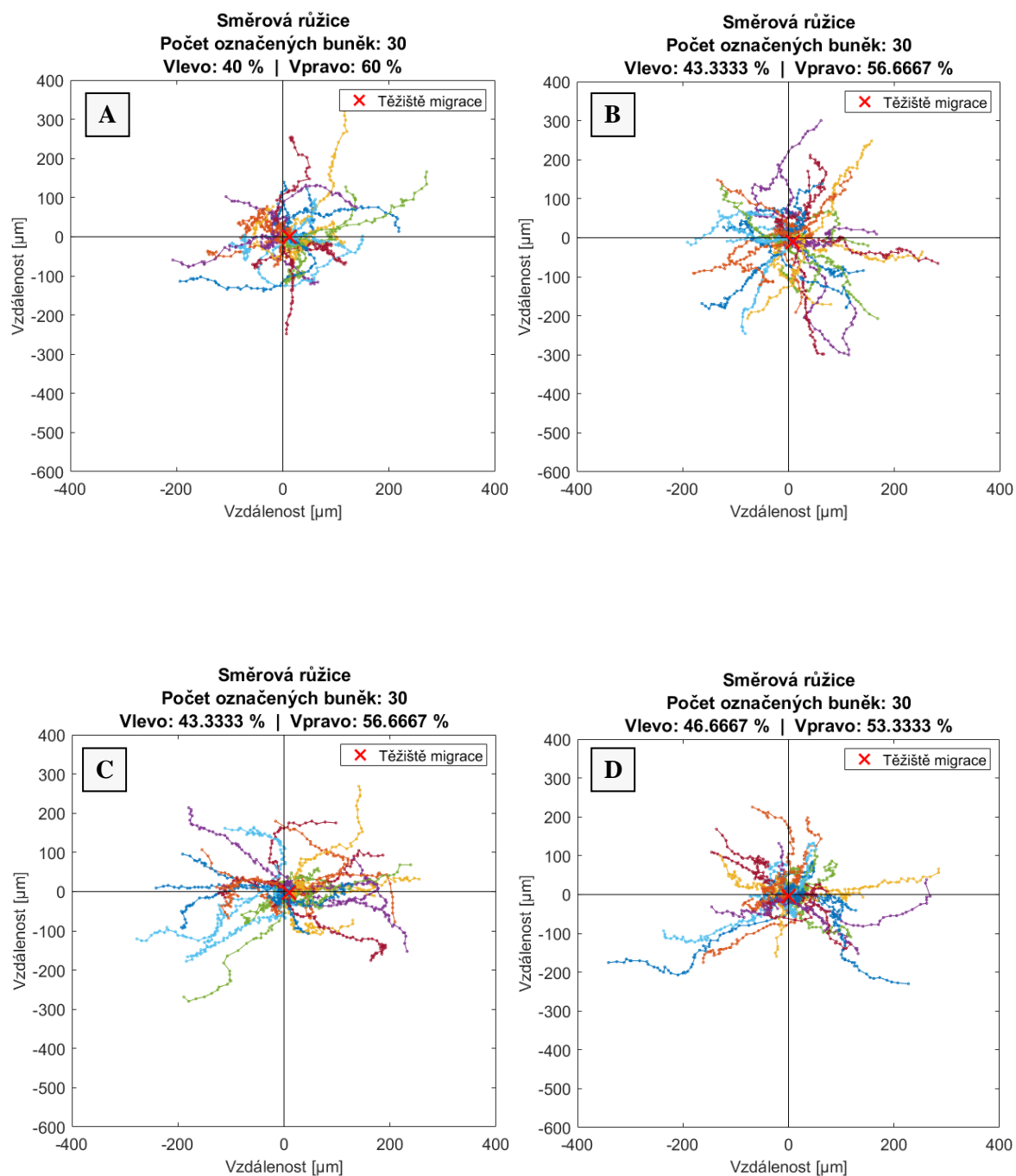
(C) kolagenový gel/fibronektin ($10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)

(D) kolagenový gel/fibronektin ($50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)

4.2.3 III. měření

Tab. 4 Tabulka celkových vzdáleností a rychlostí migrace ve třetím měření

Buňka	Celková uražená vzdálenost d_{total} [μm]				Průměrná rychlost pohybu v [μm/min]			
	Kontrola	Kolagen	Kolagen/ fibronectin (10 μg/ml)	Kolagen/ fibronectin (50 μg/ml)	Kontrola	Kolagen	Kolagen/ fibronectin (10 μg/ml)	Kolagen/ fibronectin (50 μg/ml)
1	361,34	404,89	431,04	572,50	0,36	0,41	0,44	0,58
2	322,05	454,65	419,18	467,76	0,33	0,46	0,42	0,47
3	430,54	419,22	523,49	463,04	0,43	0,42	0,53	0,47
4	413,76	432,16	476,60	552,53	0,42	0,44	0,48	0,56
5	428,72	423,86	535,80	383,38	0,43	0,43	0,54	0,39
6	458,83	417,48	578,89	474,86	0,46	0,42	0,58	0,48
7	359,51	407,32	466,06	361,14	0,36	0,41	0,47	0,36
8	348,83	410,50	479,40	456,31	0,35	0,41	0,48	0,46
9	292,23	427,22	572,69	403,92	0,30	0,43	0,58	0,41
10	372,05	457,62	574,03	572,31	0,38	0,46	0,58	0,58
11	405,04	610,55	434,35	391,12	0,41	0,62	0,44	0,40
12	380,75	376,59	660,71	488,81	0,38	0,38	0,67	0,49
13	372,91	358,87	453,83	443,46	0,38	0,36	0,46	0,45
14	472,24	474,49	498,74	505,59	0,48	0,48	0,50	0,51
15	282,54	431,50	461,63	563,43	0,29	0,44	0,47	0,57
16	307,86	388,12	501,10	469,81	0,31	0,39	0,51	0,47
17	354,73	431,90	463,91	438,09	0,36	0,44	0,47	0,44
18	428,25	545,98	473,50	435,61	0,43	0,55	0,48	0,44
19	568,67	481,01	388,65	387,74	0,57	0,49	0,39	0,39
20	319,78	448,63	464,99	498,43	0,32	0,45	0,47	0,50
21	396,25	414,09	479,61	543,37	0,40	0,42	0,48	0,55
22	407,58	560,87	519,42	505,57	0,41	0,57	0,52	0,51
23	321,15	464,44	569,17	488,51	0,32	0,47	0,57	0,49
24	440,34	442,58	609,07	532,46	0,44	0,45	0,62	0,54
25	402,66	439,37	492,08	521,67	0,41	0,44	0,50	0,53
26	394,09	492,56	596,70	392,92	0,40	0,50	0,60	0,40
27	310,87	388,71	457,89	380,81	0,31	0,39	0,46	0,38
28	360,78	501,14	422,09	542,91	0,36	0,51	0,43	0,55
29	466,66	437,11	437,18	498,35	0,47	0,44	0,44	0,50
30	295,05	491,42	457,47	429,40	0,30	0,50	0,46	0,43
μ	382,54	447,83	496,64	472,19	0,39	0,45	0,50	0,48



Obr. 20 Směrová růžice pro III. měření:

(A) kontrolní skupina

(B) kolagenový gel

(C) kolagenový gel/fibronektin ($10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)

(D) kolagenový gel/fibronektin ($50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)

5 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ DAT

Číselné výsledky experimentů jsou podkladem pro analýzu pomocí statistických testů. Vyhodnocení dat obsahuje dvě části. Nejprve zkusíme analyzovat, jestli kultivace v kolagenovém gelu má vliv na parametry buněčné migrace. Ve druhé části ohodnotíme vliv přidání fibronektinu do kolagenového gelu.

Základem analýzy bude porovnávání délek tras buněk (a také rychlostí migrace) ve všech testových skupinách zvlášť pro každé měření. Chceme ověřit, zda je střední hodnota těchto parametrů přibližně stejná ve všech skupinách.

Statistické metody, které umožňují provádět vícenásobné porovnávání středních hodnot, jsou soustředěny pod souhrnným názvem analýza rozptylu (ANOVA – Analysis of Variance). Tato metoda je založena na hodnocení vztahů mezi rozptyly porovnávaných výběrových skupin. Metoda je vhodným testem pro více než dva výběry. Jsme si zvolili jednofaktorovou analýzu rozptylu, nebo one-way ANOVA (příkaz *anova1* v MATLAB), protože analyzujeme účinek jednoho faktoru na parametry buněčné migrace.

Analýza rozptylu má stejně jako většina dalších statistických testů svoje předpoklady, bez jejichž splnění nelze na její výsledky spoléhat. Předpoklady analýzy rozptylu jsou následující:

- nezávislost měření (uvnitř skupin i mezi skupinami);
- normální rozdělení dat v jednotlivých skupinách;
- stejný rozptyl hodnot ve všech srovnávaných skupinách.

Pro ověření předpokladu normálního rozložení a shody rozptylu dat ve skupinách jsme použili vícevýběrový test o shodnosti (homogenitě) rozptylů (F-test, příkaz *vartestn* v MATLAB).

Výsledkem obou testů je tzv. p-hodnota, která určuje, na jaké hladině významnosti je možné zamítnout nulovou hypotézu. Porovnává se nejčastěji s hodnotou 0,05 a je-li p-hodnota menší, zamítáme nulovou hypotézu.

Na začátku musíme ověřit rozložení dat a rozptyl v každé testovací skupině pomocí F-testu. Nulovou a alternativní hypotézu F-testu vyjádříme jako:

$$H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma_3^2 = \sigma_4^2, \quad H_A: \neg H_0 \quad (4)$$

kde σ_1^2 je rozptyl v kontrolní skupině, σ_2^2 je rozptyl ve skupině „Kolagenový gel“ a σ_3^2 je rozptyl ve skupině „Kolagenový gel/FN (10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)“, σ_4^2 je rozptyl ve skupině „Kolagenový gel/FN (50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)“.

Výsledné p-hodnoty F-testu jsme zanesli do tabulky (viz Tab. 5).

Tab. 5 F-test

Číslo měření	p-hodnota	
	Celková uražená vzdálenost d_{total}	Rychlost pohybu buněk v
1	0,1626	0,1372
2	0,0830	0,0944
3	0,8114	0,8799

Jak vidíme z tabulky, ve všech skupinách jsme prokázali shodu rozptylu (p-hodnota F-testu je větší než 0,05 ve všech skupinách, což znamená, že nezamítáme nulovou hypotézu). Data v jednotlivých skupinách splňují předpoklady parametrického ANOVA testu.

Stejně jako u F-testu musíme vyjádřit nulovou a alternativní hypotézu pro one-way ANOVA:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4, \quad H_A: \neg H_0 \quad (5)$$

kde μ_1 je střední hodnota délek tras buněk (nebo rychlostí migrace) v kontrolní skupině, μ_2 je střední hodnota délek tras buněk (nebo rychlostí migrace) ve skupině „Kolagenový gel“, μ_3 je střední hodnota délek tras buněk (nebo rychlostí migrace) ve skupině „Kolagenový gel/FN (10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)“, μ_4 je střední hodnota délek tras buněk (nebo rychlostí migrace) ve skupině „Kolagenový gel/FN (50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)“.

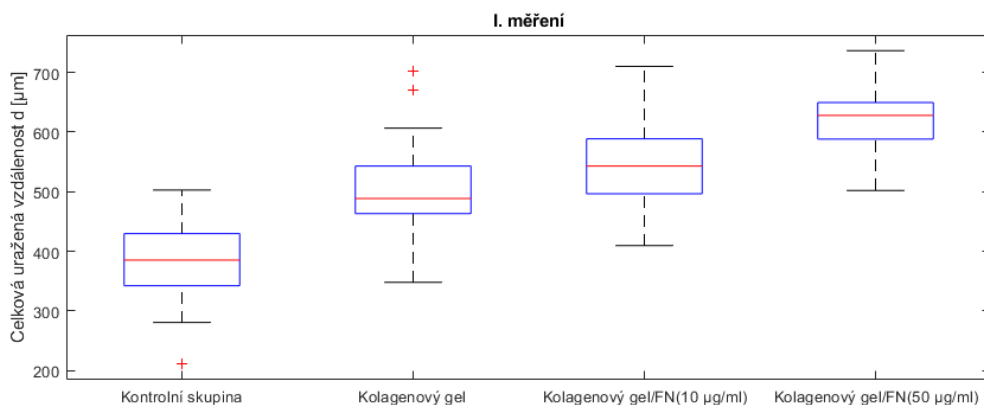
V dalších podkapitolách jsou uvedeny podrobné výsledky použití ANOVA testů pro každé měření.

5.1 Hodnocení vlivu prostředí gelu na parametry buněčné migrace

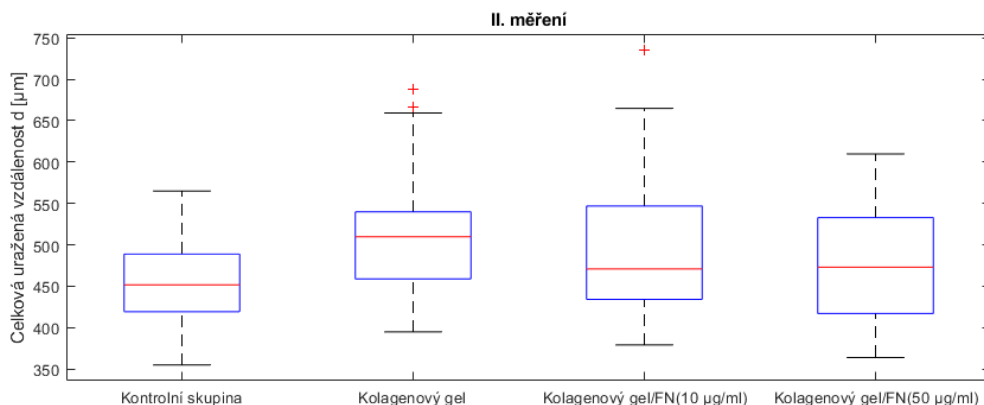
Kontrolní skupina obsahuje buňky, které byly kultivovány jen v přítomnosti média. Buňky v ostatních skupinách byly kultivovány v hustším prostředí kolagenového gelu. V této podkapitole bude provedeno srovnání kontrolní skupiny se všemi ostatními skupinami pomocí ANOVA testu.

5.1.1 Porovnání délek tras buněk

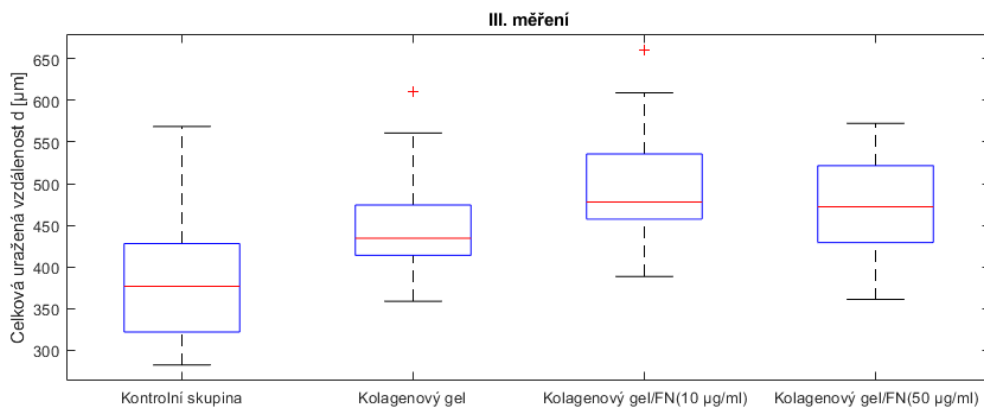
Prvním z analyzovaných parametrů buněčné migrace je celková uražená vzdálenost d_{total} . Pro grafickou vizualizaci těchto hodnot byly použity krabicové diagramy neboli boxploty. Na Obr. 21–23 jsou reprezentovány jednotlivé boxploty pro každé měření.



Obr. 21 Krabicový diagram délek tras buněk pro I. měření



Obr. 22 Krabicový diagram délek tras buněk pro II. měření



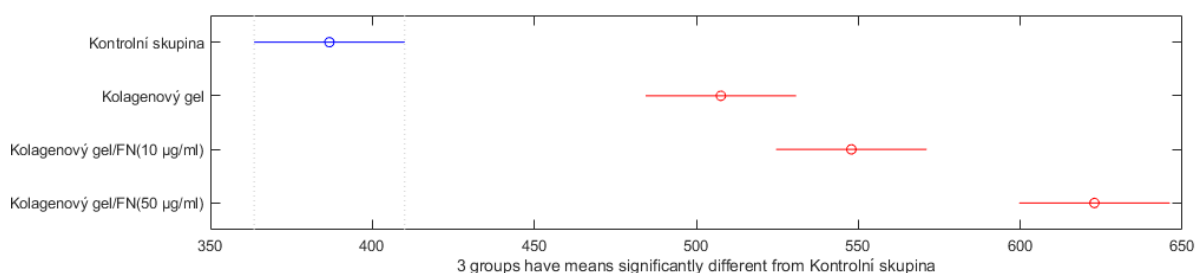
Obr. 23 Krabicový diagram délek tras buněk pro III. měření

Výsledné p-hodnoty ANOVA testu jsme zanesli do tabulky (viz Tab. 6).

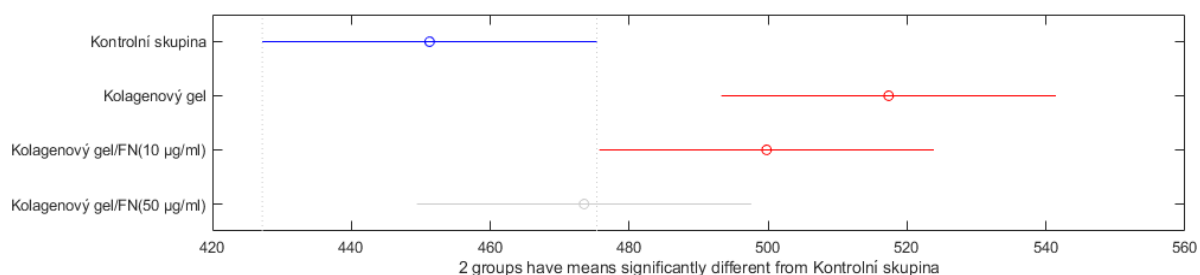
Tab. 6 One-way ANOVA (celková uražená vzdálenost, 1.test)

Číslo měření	p-hodnota
1	8,0109 ⁻²⁴
2	0,0029
3	4,6986 ⁻¹⁰

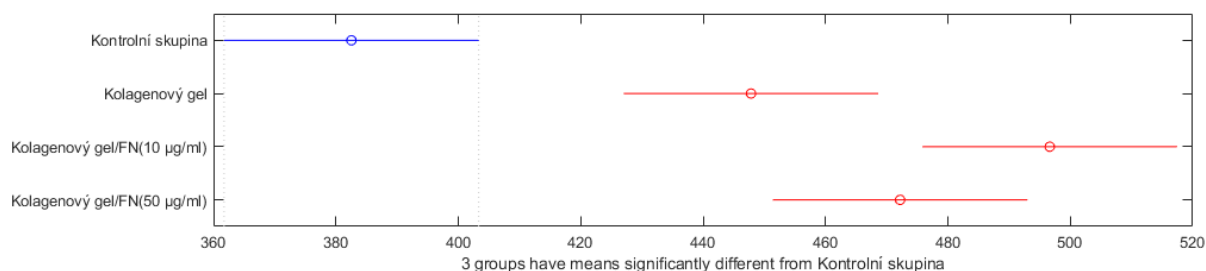
Další grafické výstupy ANOVA testů jsou uvedeny na Obr. 24–26.



Obr. 24 One-way ANOVA (celková uražená vzdálenost, 1.test, I. měření)



Obr. 25 One-way ANOVA (celková uražená vzdálenost, 1.test, II. měření)

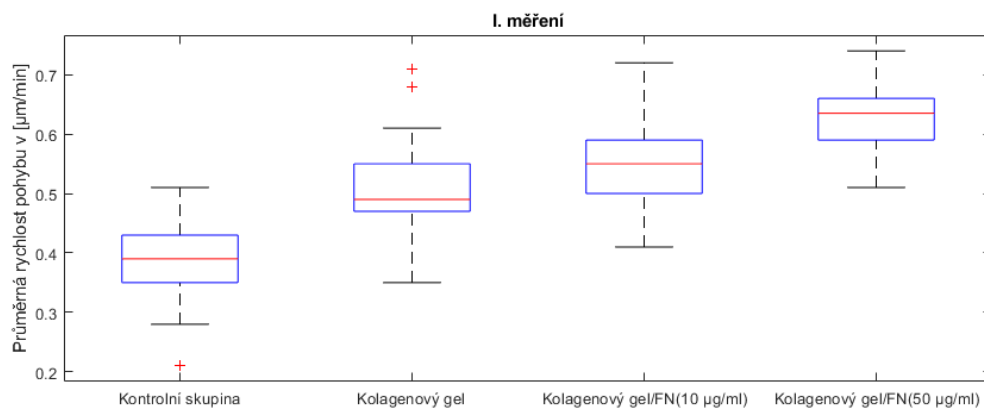


Obr. 26 One-way ANOVA (celková uražená vzdálenost, 1.test, III. měření)

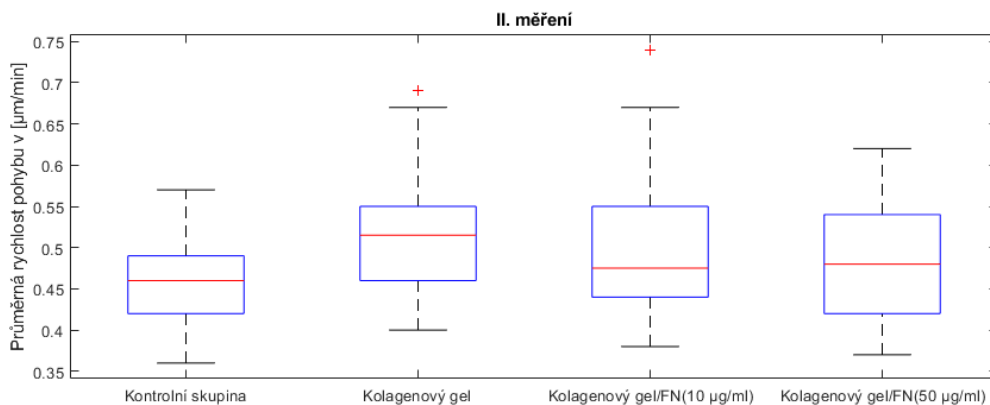
Z Tab. 6 vidíme, že p-hodnota testu ANOVA je menší než 0,05 ve všech měřeních, což znamená, že zamítáme nulovou hypotézu o shodě středních hodnot délek tras buněk. Tím jsme prokázali, že je přítomen signifikantní rozdíl mezi skupinami ve všech měřeních.

5.1.2 Porovnání rychlostí buněčné migrace

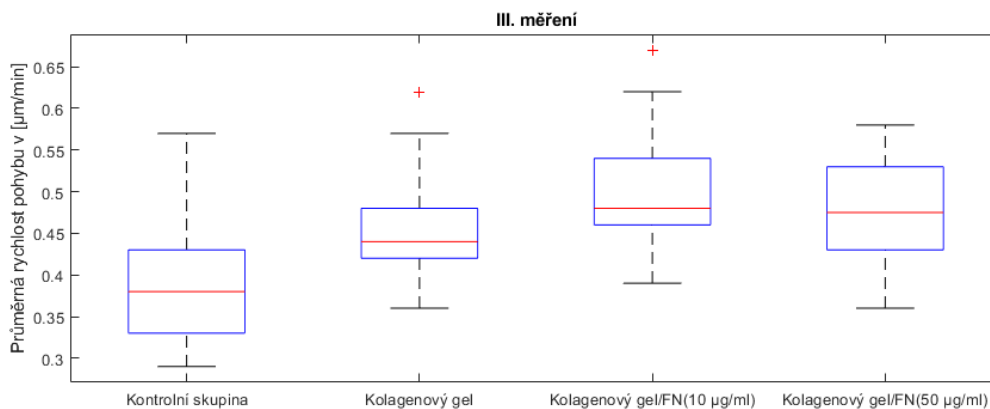
Dalším analyzovaným parametrem buněčné migrace je rychlost pohybu jednotlivých buněk v . Jednotlivé krabicové diagramy pro každé měření jsou reprezentovány na Obr. 27–29.



Obr. 27 Krabicový diagram rychlostí buněčné migrace pro I. měření



Obr. 28 Krabicový diagram rychlostí buněčné migrace pro II. měření



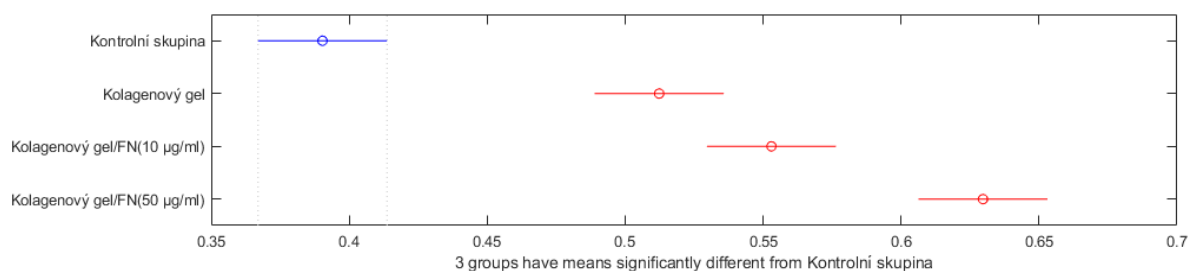
Obr. 29 Krabicový diagram rychlostí buněčné migrace pro III. měření

Výsledné p-hodnoty ANOVA testu jsme zanesli do tabulky (viz Tab. 7).

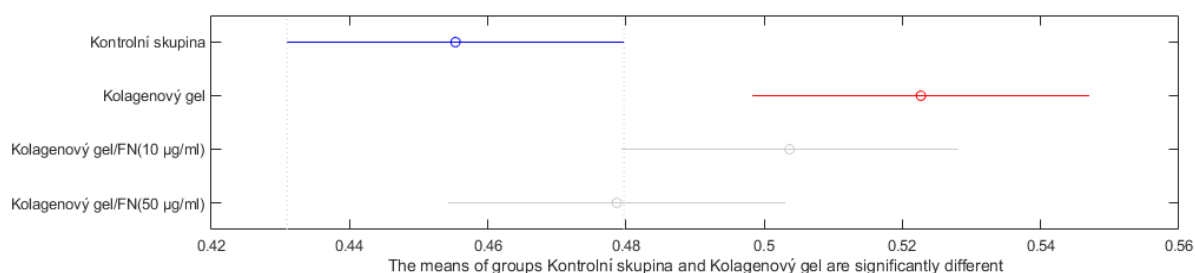
Tab. 7 One-way ANOVA (průměrná rychlost pohybu buněk, I.test)

Číslo měření	p-hodnota
1	5,0741 ⁻²⁴
2	0,0029
3	4,7253 ⁻¹⁰

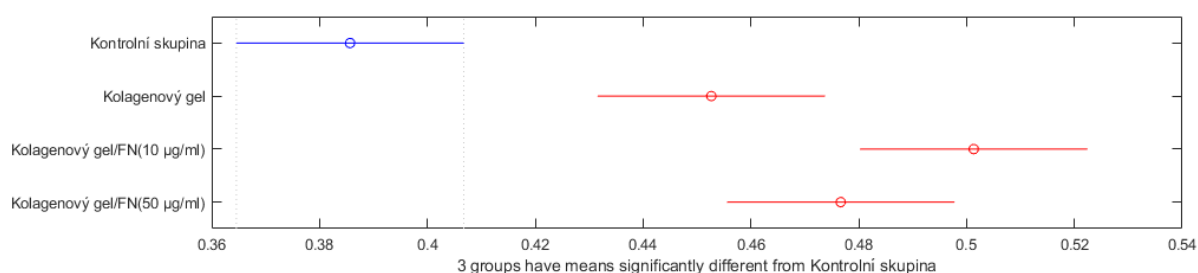
Další grafické výstupy ANOVA testů jsou uvedeny na Obr. 30–32.



Obr. 30 One-way ANOVA (průměrná rychlost pohybu buněk, I.test, I. měření)



Obr. 31 One-way ANOVA (průměrná rychlost pohybu buněk, I.test, II. měření)



Obr. 32 One-way ANOVA (průměrná rychlost pohybu buněk, I.test, III. měření)

Z Tab. 7 vidíme, že p-hodnota testu ANOVA je menší než 0,05 ve všech měřeních, což znamená, že zamítáme nulovou hypotézu o shodě středních hodnot průměrných rychlostí buněčné migrace. Tím jsme prokázali, že je přítomen signifikantní rozdíl mezi skupinami ve všech měřeních.

5.2 Hodnocení vlivu přidání fibronektinu do kolagenového gelu

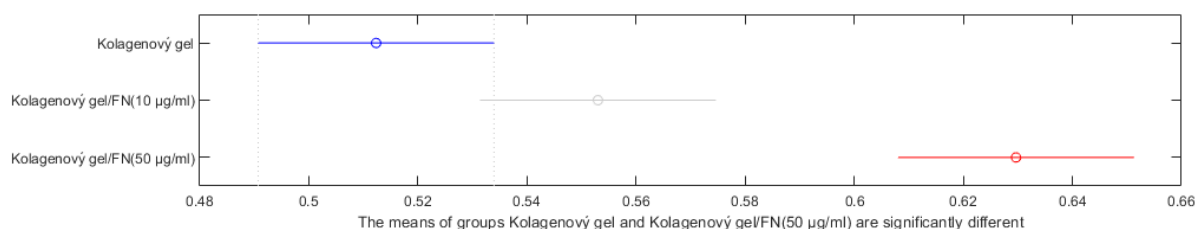
Cílem tohoto statistického testu je ověření teoretického předpokladu o tom, že přidání fibronektinu do kolagenového gelu stimuluje buněčnou motilitu (viz Kap. 2.4.2). Kontrolní skupina obsahuje buňky, které byly kultivovány jen v přítomnosti média, proto tato skupina nebude zahrnuta do testu. Testování rychlostí migrace buněk je provedeno pomocí ANOVA testu.

Výsledné p-hodnoty ANOVA testu jsme zanesli do tabulky (viz Tab. 8).

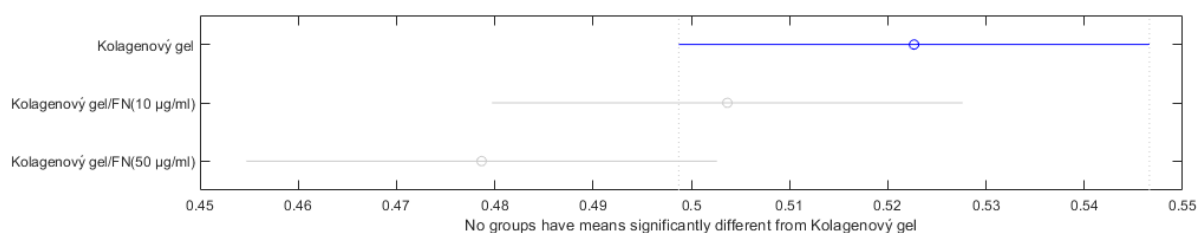
Tab. 8 One-way ANOVA (2.test)

Číslo měření	p-hodnota
1	$2,4290^{-8}$
2	0,0955
3	$4,7253^{-10}$

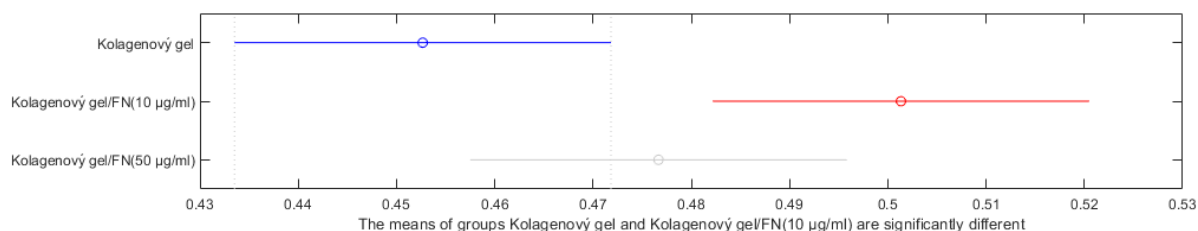
Další grafické výstupy ANOVA testů jsou uvedeny na Obr. 33 - 35.



Obr. 33 One-way ANOVA (2.test, I. měření)



Obr. 34 One-way ANOVA (2.test, II. měření)



Obr. 35 One-way ANOVA (2.test, III. měření)

Z Tab. 8 je patrné, že p-hodnota testu ANOVA je v I. a III. měřeních menší než 0,05, což znamená, že zamítáme nulovou hypotézu o shodě středních hodnot průměrných rychlostí buněčné migrace. Z toho vyplývá, že je přítomen signifikantní rozdíl mezi skupinami.

V případě II. měření byl získán opačný výsledek. Tím jsme zjistili, že přidání fibronektinu do gelu ovlivňuje rychlost buněčné migrace, ale nepodařilo se nám to jednoznačně prokázat.

V Kap. 2.4.2 bylo také naznačeno, že fibronektin přidaný do kolagenového gelu ovlivňuje cesty buněčné migrace *in vivo* i v kultuře. Pro ověření této skutečnosti lze provést vyhodnocení čisté vzdálenosti, kterou buňka prošla během experimentu a která odráží směrovost migrace (podrobně viz Kap. 4.1).

Čistá (Euklidova) vzdálenost byla zjištěna také pomocí algoritmu navrženého v MATLABu. Hodnoty vzdáleností pro buňky v jednotlivých skupinách (s výjimkou kontrolní skupiny) pro všechna měření jsou uvedeny v Tab. 11.

Pro vyhodnocení byl opět použit test one-way ANOVA. Před jeho začátkem byla provedena analýza rozptylu (princip je popsán v Kap. 5). Výsledné p-hodnoty F-testu jsme zanesli do tabulky (viz Tab. 9). Z nichž je vidět, že rozptyl hodnot je ve všech skupinách stejný (p-hodnota F-testu je větší než 0,05, nezamítáme nulovou hypotézu).

Po ověření shody rozptylu byl na hodnoty čistých vzdáleností aplikován ANOVA test. Výsledné p-hodnoty ANOVA testu jsme zanesli do tabulky (viz Tab. 10).

Tab. 9 F-test

Číslo měření	p-hodnota
1	0,1699
2	0,0729
3	0,0501

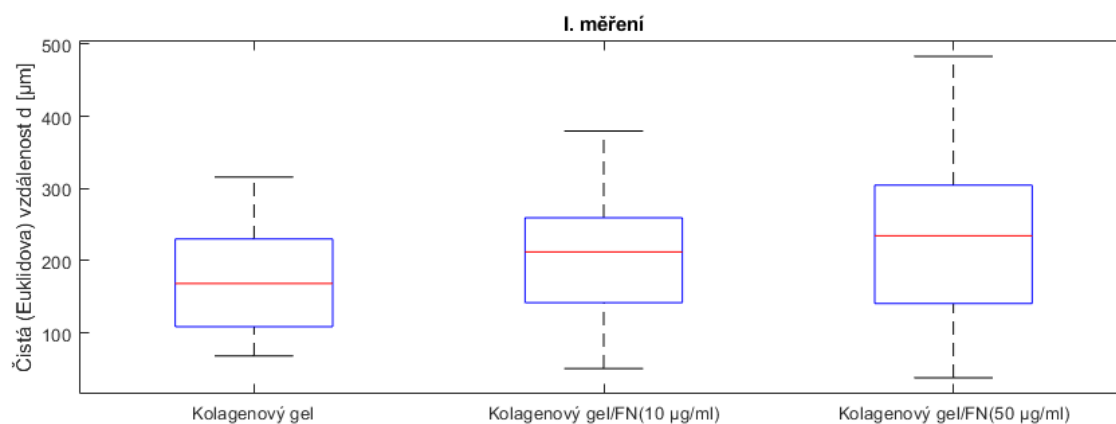
Tab. 10 One-way ANOVA (3.test)

Číslo měření	p-hodnota
1	0,1089
2	0,8092
3	0,0598

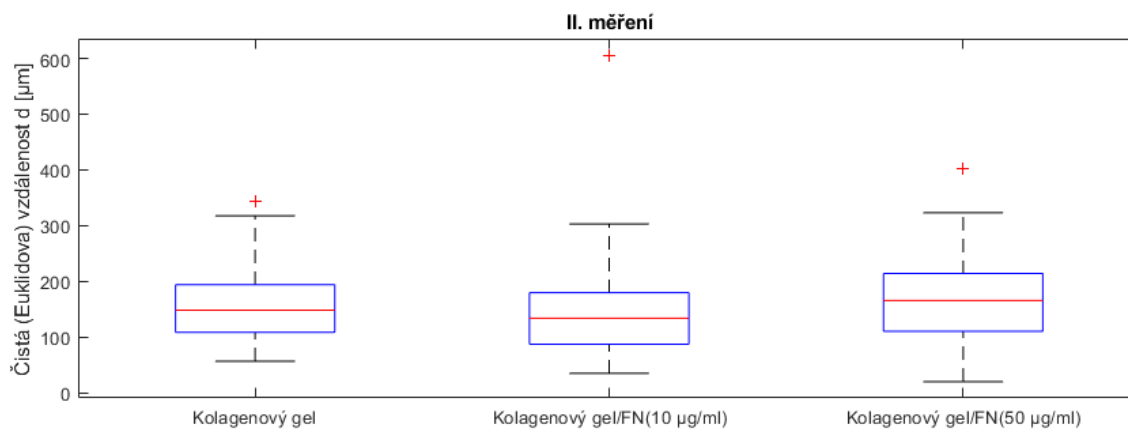
Tab. 11 Tabulka hodnot Euklidovy vzdálenosti pro všechna měření

Buňka	Čistá (Euklidova) vzdálenost d_{net} [μm]								
	I. měření			II. měření			III. měření		
	Kolagen	Kolagen/ FN (10 μg/ml)	Kolagen/ FN (50 μg/ml)	Kolagen	Kolagen/ FN (10 μg/ml)	Kolagen/ FN (50 μg/ml)	Kolagen	Kolagen/ FN (10 μg/ml)	Kolagen/ FN (50 μg/ml)
1	87,90	117,11	163,10	188,55	113,75	248,55	234,89	213,72	383,59
2	75,76	71,83	280,94	344,07	58,00	136,97	191,59	57,91	238,28
3	215,98	372,79	326,29	126,91	196,72	173,03	255,13	148,71	291,93
4	105,39	337,54	110,05	189,25	170,00	323,06	187,44	277,63	264,47
5	251,96	152,54	212,47	132,36	179,38	227,47	151,54	54,27	122,20
6	230,06	141,65	157,26	80,79	69,19	213,86	258,99	302,61	254,32
7	311,58	71,94	252,21	202,53	57,01	402,96	215,50	208,57	182,00
8	111,68	97,93	270,33	146,26	183,77	89,19	164,26	116,20	37,66
9	125,29	186,52	364,01	125,85	302,91	103,01	132,36	188,06	69,19
10	108,53	246,63	130,23	61,59	77,82	113,16	188,29	171,00	160,87
11	270,38	250,01	42,50	157,78	606,30	270,10	202,59	156,51	201,60
12	276,99	255,39	109,96	218,13	86,93	108,08	78,18	328,21	161,00
13	112,38	190,19	72,26	200,85	141,34	157,70	116,38	246,38	57,06
14	187,05	50,51	170,28	193,71	77,35	134,09	289,71	200,64	216,73
15	315,83	227,60	337,08	316,23	137,43	109,96	125,85	241,32	323,35
16	133,47	295,20	320,16	105,39	121,94	48,26	201,45	180,43	201,24
17	82,44	301,44	37,52	317,49	133,94	115,13	293,48	256,78	163,82
18	107,89	238,78	230,33	108,15	129,99	203,09	306,52	176,59	133,20
19	163,88	141,01	483,09	86,48	115,13	19,57	266,84	86,93	100,56
20	147,52	349,53	261,66	107,31	123,19	201,60	191,44	255,82	33,82
21	67,87	259,39	238,56	149,55	271,56	75,35	305,24	238,08	30,94
22	207,52	123,04	91,45	56,33	156,69	197,55	210,30	213,66	133,82
23	181,14	177,97	275,73	154,11	125,19	156,12	199,71	223,14	235,34
24	290,14	196,40	341,04	145,10	163,82	312,87	221,00	303,25	141,22
25	123,14	158,73	304,55	126,42	143,67	188,50	166,32	279,34	149,04
26	189,32	209,56	367,00	219,93	285,39	246,38	181,84	248,43	66,13
27	279,39	379,66	140,54	138,20	133,32	129,69	148,56	196,26	140,33
28	172,91	293,93	267,61	84,94	265,63	60,06	174,46	112,61	173,86
29	213,22	235,13	146,26	182,74	47,83	201,40	152,70	128,69	35,61
30	101,97	214,62	209,41	178,16	34,65	189,17	204,46	124,94	66,33
μ	174,95	211,49	223,80	161,51	156,99	171,86	200,57	197,89	158,98

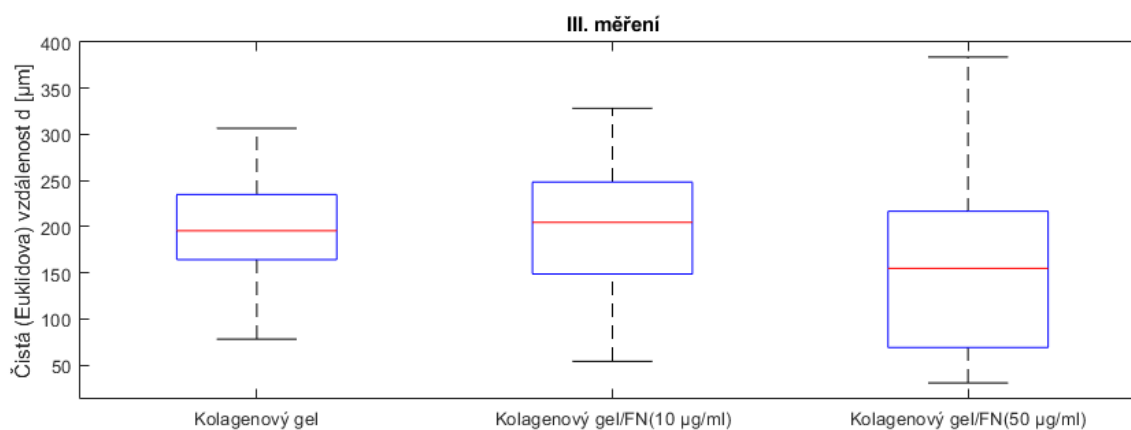
Jednotlivé krabicové diagramy pro každé měření jsou reprezentovány na Obr. 36–38.



Obr. 36 Krabicový diagram čistých vzdáleností pro I. měření

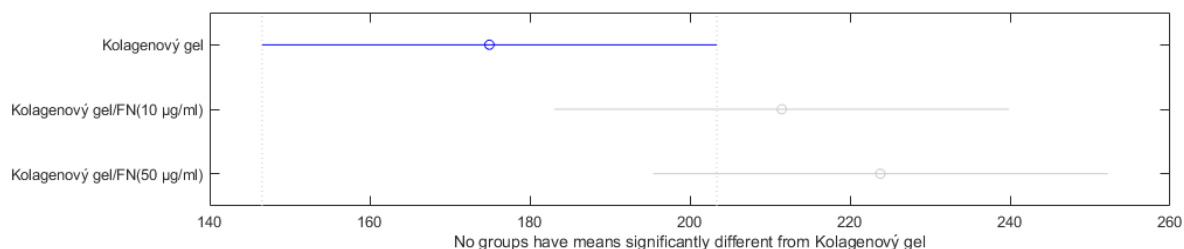


Obr. 37 Krabicový diagram čistých vzdáleností pro II. měření

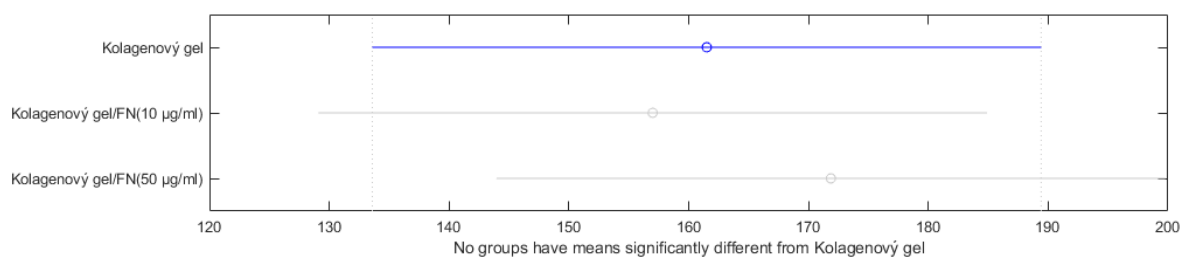


Obr. 38 Krabicový diagram čistých vzdáleností pro III. měření

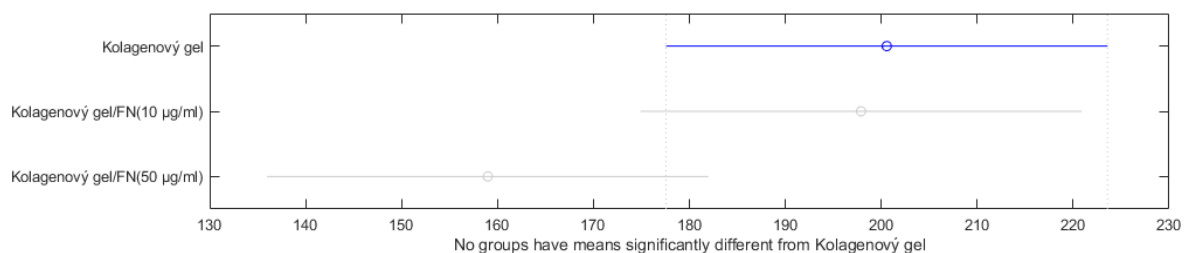
Další grafické výstupy ANOVA testů jsou uvedeny na Obr. 39–41. Z Tab. 10 vidíme, že p-hodnota testu je větší než 0,05 ve všech měřeních, což znamená, že nezamítáme nulovou hypotézu o shodě středních hodnot čistých vzdáleností. Z toho vyplývá, že není přítomen signifikantní rozdíl mezi skupinami ve všech měřeních.



Obr. 39 One-way ANOVA (3.test, I. měření)



Obr. 40 One-way ANOVA (3.test, II. měření)



Obr. 41 One-way ANOVA (3.test, III. měření)

6 ZÁVĚR

Tato diplomová práce je rozdělena na dvě části. Část první je teoretická. Obsahuje popis mezenchymálních kmenových buněk (MSC), jejich vlastností a potenciálu použití v regenerativní medicíně. Následuje seznámení s principy a motivací kultivace buněk ve 3D prostředí a popis souvislostí tohoto prostředí s ECM (extracelulární matrix). Jsou zde shrnuty požadavky na umělé podklady. Závěrem teoretické části je vyjmenování a popis jednotlivých přírodních a umělých materiálů, které se používají pro tvorbu umělého 3D prostředí.

Druhá polovina diplomové práce je věnována experimentální části. Cílem bylo navrhnout experiment pro sledování migrace buněk MSC v umělé ECM. Materiálem pro tvorbu tohoto prostředí byl zvolen kolagen. Navržený experiment spočíval v přípravě kolagenového gelu, přidání buněk do tohoto gelu a jejich sledování v takovém prostředí. Pro umožnění sledování byly buňky obarveny fluorescenčními barvivy.

První testovaná koncentrace kolagenu v gelu byla $1,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Z obrázků získaných pomocí konfokálního mikroskopu je vidět, že přidáním buněk do gelu byl zahájen proces jejich růstu a migrace v tomto 3D prostředí (viz Obr. 8–10). Po 1 hodině inkubace můžeme pozorovat kulaté buňky v celé tloušťce a na povrchu kolagenového gelu, které se dají rozlišit použitím různých fluorescenčních barviv. Po 24 hodinách inkubace došlo k růstu buněk a jejich postupnému protahování. Nakonec po 96 hodinách došlo k výraznému zvětšení počtu buněk a jejich rozměru. V tuto chvíli již většina buněk měla vřetenovitý tvar. Tvorba a prodlužování buněčných výběžků je spojena s polymerizací aktinu a s regulací stabilních adherentních spojů buňky s umělým ECM nebo okolními buňkami. Tento experiment potvrdil, že buňky jsou schopné proliferovat a migrovat v kolagenovém gelu stejně jako na jeho povrchu, což potvrzuje teoretický předpoklad vhodnosti kolagenového gelu pro imitaci přirozeného prostředí.

Výsledek experimentu s využitím gelu o nižší koncentraci kolagenu ($1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) je zobrazen na Obr. 11. V tomto případě došlo k tomu, že buňky přidané do gelu se usadily na dně konfokální misky a adherovaly stejně jako buňky přidané na povrch gelu. Během tohoto experimentu bylo zjištěno, že optické vlastnosti hustšího kolagenového gelu (koncentrace $1,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) ovlivňují výsledek měření z hlediska pořízení mikroskopických snímků. Na základě toho byla pro navržení vlastního experimentu ke studiu migrace buněk v ECM zvolena nižší koncentrace kolagenu v gelu, $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Pro umožnění kvantitativního hodnocení buněčné migrace byl představen další experiment s využitím gelu o menší koncentraci kolagenu ($1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$). Navržený algoritmus byl použit za účelem hodnocení migrace buněk MSC v umělém 3D prostředí. Navíc byl experiment modifikován přidáním fibronektinu ve dvou různých koncentracích ($10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ a $50 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) do zvolených jamek pro testování jeho vlivu na buněčnou migraci. V rámci sběru dat bylo provedeno intervalové snímání buněk. Princip každého měření spočíval v dlouhodobém snímání čtyř jamek, které tvořily čtyři experimentální skupiny. Byla provedena celkem tři nezávislá měření.

Pro analýzu mikroskopických snímků byl v programovém prostředí MATLAB vytvořen algoritmus, který umožňuje sledování jednotlivých buněk jejich manuálním označováním. Na základě získaných dat se určují parametry migrace, jako jsou celková uražená vzdálenost, čistá vzdálenost a rychlost pohybu buněk. Získané hodnoty byly analyzovány pomocí statistických testů.

První analýza byla zaměřena na hodnocení vlivu prostředí gelu na parametry buněčné migrace. Při klasické dvourozměrné kultivaci buňky postrádají komponenty z trojrozměrné ECM, která se vyskytuje *in vivo*. Proto lze předpokládat, že chování buněk kultivovaných v prostém médiu se bude lišit od chování buněk kultivovaných v kolagenovém gelu, imitujícím přirozené prostředí. Test spočíval v porovnání kontrolní skupiny se všemi ostatními skupinami pomocí ANOVA testu, a to na základě hodnot celkových vzdáleností a rychlostí pohybu buněk. Výsledkem je skutečnost, že je přítomen signifikantní rozdíl mezi skupinami ve všech měřeních (viz Tab. 6, Tab. 7). To znamená, že prostředí gelu určitým způsobem ovlivňuje migraci buněk. Jak je vidět z Tab. 2–4, buňky kultivované v kolagenovém gelu se pohybují s větší rychlostí.

Cílem druhé analýzy bylo zjistit, jaký vliv má přidání fibronektinu do kolagenového gelu. Při počáteční interakci mezi buňkami a scaffoldem hraje důležitou roli právě fibronectin. Má určité domény s vazebnými místy, která jsou důležitá při adhezi a diferenciaci buněk.

První test sloužil k ověření teoretického předpokladu, že přidání fibronektinu do kolagenového gelu stimuluje buněčnou motilitu. Kontrolní skupina nebyla zahrnuta do testu. Pro vyhodnocení byl opět použit test one-way ANOVA. Z Tab. 8 je patrné, že ve dvou měřeních se nám podařilo prokázat zvětšení rychlosti migrace buněk po přidání fibronektinu. Ve třetím měření byl získán opačný výsledek. Tím jsme zjistili, že přidání fibronektinu do gelu ovlivňuje rychlost buněčné migrace, ale nepodařilo se nám to jednoznačně prokázat.

Další test byl navržen tak, aby ověřil předpoklad, že fibronectin přidaný do kolagenového gelu ovlivňuje cesty buněčné migrace. Vyhodnocení spočívalo v porovnání hodnot čistých vzdáleností pomocí ANOVA testu. Čistá vzdálenost popisuje přímou vzdálenost mezi počátečním a konečným bodem. Z definice vyplývá, že největší hodnota bude odpovídat přímočarému pohybu buňky. Z Tab. 10 lze odhadnout, že střední hodnota čisté vzdálenosti se neliší mezi skupinami ve všech měřeních. Souhrnně lze říct, že fibronectin přidaný do kolagenového gelu neovlivnil směr buněčné migrace v našem experimentu.

Jak již bylo řečeno v Kap. 2.4.2, přidání fibronectinu do gelu ovlivňuje nejen rychlost migrace buněk, ale také i buněčnou morfologii a proliferaci. Pro subjektivní analýzu lze použít snímky buněk MSC pořízené ve stejný časový okamžik (viz Obr. 12). Je vidět, že buňky kultivované jen v přítomnosti média mají protáhlý tvar, buněčné výběžky jsou dostatečně krátké a jejich počet je malý. Na rozdíl od těchto buněk mají buňky kultivované v kolagenovém gelu mnohem větší plochu, buněčné výběžky jsou dlouhé, nitkovité a je jich mnohem více.

Na závěr bych chtěla zdůraznit, že výsledky uvedených experimentů nelze pokládat za obecně platné a zcela reprezentativní v důsledku příliš malého počtu měření.

Vyrobení umělého 3D prostředí z kolagenu (a také z libovolného biologického materiálu) však představuje výzvu. Mezi hlavní nevýhody přírodních materiálů patří jejich nedostatečná mechanická pevnost a špatná reprodukovatelnost. Rozdíly ve složení, způsobené různým obsahem přírodních příměsí, mění jejich výsledné vlastnosti. Nedávají tedy vždy záruku přesně definovaných charakteristik materiálu. Z tohoto hlediska je možné opakovat experiment s použitím syntetického komerčně dostupného hydrogelu.

LITERATURA

- [1] YAMADA, K. M., SIXT, M. Mechanisms of 3D cell migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. 2019, vol. 20, s. 738-752 [cit. 29.12.2019]. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/s41580-019-0172-9>
- [2] PITTENGER, M. F., MACKAY, A. M., BECK, S. C., JAISWAL, R. K., DOUGLAS, R., MOSCA, J. D., MOORMAN, M. A., SIMONETTI, D. W., CRAIG, S., MARSHAK, D. R Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999, vol. 284, pp. 143-147.
- [3] ZACHAR, L., BAČENKOVÁ, D., ROSOCHA, J. Activation, homing, and role of the mesenchymal stem cells in the inflammatory environment. *Journal of Inflammation Research* [online]. 15.12.2016, s. 231-240 [cit. 29.11.2019]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/311860123_Activation_homing_and_role_of_the_mesenchymal_stem_cells_in_the_inflammatory_environment
- [4] *Mesenchymal stem cells* [online]. Innovita research [cit. 29.11.2019]. Dostupné z: <https://www.innovitaresearch.com/products/mesenchymal-stem-cells/>
- [5] BOBIS, S., JAROCHA, D., MAJKA, M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochemica Et Cytobiologica*. 2006, vol. 44, s. 215-230.
- [6] AFANASYEV, B. V., ELSTNER, E., ZANDER, A. R. A .J. Friedenstein, founder of the mesenchymal stem cell concept. *Cellular Therapy and Transplantation* [online]. 2009, vol. 1, no. 3 [cit. 29.11.2019]. Dostupné z: <http://cttjournal.com/en/archive/tom-1-nomer-3/osnovnye-avtory/a-ya-fridenshteyn-osnovatel-kontseptsii-mezenkhimalnoy-stvolovoy-kletki/>
- [7] LIU, Z.-J., ZHUGE, Y., VELAZQUEZ, O. C. Trafficking and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Cellular Biochemistry* [online]. 2009, vol. 106, issue 6, s. 984-991 [cit. 29.11.2019]. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcb.22091>
- [8] *3D kultury* [online]. Biotechnologie PřF UJEP [cit. 29.11.2019]. Dostupné z: <http://biotech.biology.ujep.cz/node/51>
- [9] COMLEY, J. *3D cell culture: easier said than done!* [online]. [cit. 29.11.2019]. Dostupné z: <https://www.semanticscholar.org/paper/Cell-Culture-3-D-CELL-CULTURE-easier-said-than-done-Comley/c55da26cdcc6462c319cdf411e181ae748fbb57>
- [10] DE PASCALIS, C., ETIENNE-MANNEVILLE, S. Single and collective cell migration: The mechanics of adhesions. *Molecular biology of the cell* [online]. 2017,

- vol. 28, s. 1833-1846 [cit. 29.11.2019]. Dostupné z:
https://www.researchgate.net/publication/318600940_Single_and_collective_cell_migration_The_mechanics_of_adhesions
- [11] EVEN-RAM, S., YAMADA, K. M. Cell migration in 3D matrix. *Current Opinion in Cell Biology* [online]. 2005, vol. 17, s. 524-532 [cit. 29.11.2019]. Dostupné z:
https://www.researchgate.net/publication/7647617_Cell_migration_in_3D_matrix
- [12] *In vitro přístupy k analýze migrace buněk* [online]. [cit. 29.11.2019]. Dostupné z:
http://organonet.med.muni.cz/media/62510/vy_04.pdf
- [13] RÉDEI, G. P. *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics, and Informatics*. 3rd Edition. Springer, 2008. ISBN 978-1-4020-6753-2.
- [14] BRICHOVÁ, H. *Tkáně - rozdělení, základní stavba a funkce. Pojiva - obecná charakteristika. Mezibuněčná hmota, její tvorba a složení. Stavba chrupavky* [online]. Praha, 18.10.2013 [cit. 29.11.2019]. Dostupné z: <https://docplayer.cz/9878953-Tkane-rozdeleni-zakladni-stavba-a-funkce-pojiva-obecna-charakteristika-mezibunecna-hmota-jeji-tvorba-a-slozeni-stavba-chrupavky.html>
- [15] *The extracellular matrix and cell wall* [online]. [cit. 29.11.2019]. Dostupné z:
<https://www.khanacademy.org/science/biology/structure-of-a-cell/cytoskeleton-junctions-and-extracellular-structures/a/the-extracellular-matrix-and-cell-wall>
- [16] KAŠPAROVÁ, M. Biologické vlastnosti scaffoldů studovaných pomocí bioreaktorů [online]. [cit. 29.11.2019]. Dostupné z:
https://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/45471/ka%C5%A1parov%C3%A1_2019_dp.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- [17] GREGOR, A. *Experimentální metody 3D tisku biologických scaffoldů pro tkáňové inženýrství* [online]. [cit. 30.11.2019]. Dostupné z:
<https://stc.fs.cvut.cz/history/2011/sbornik/papers/pdf/1100005-1.pdf>
- [18] WOLF, K., ALEXANDER, S., SCHACHT, V., COUSSENS, L. M., VON ANDRIAN, U. H., VAN RHEENEN, J., DERYUGINA, E., FRIEDL, P. Collagen-based cell migration models in vitro and in vivo. *Seminars in Cell & Developmental Biology* [online]. 2009, vol. 20, s. 931-941 [cit. 30.11.2019]. Dostupné z:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S108495210900161X>
- [19] *Collagen Type I, Rat Tail* [online]. Ibidi [cit. 30.11.2019]. Dostupné z:
<https://ibidi.com/cell-culture-microscopy/107-collagen-type-i-rat-tail.html>
- [20] SITTERLEY, G. *Fibronectin* [online]. BioFiles 2008 [cit. 30.11.2019]. Dostupné z:
<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/fibronectin.html>
- [21] SALIH, V. *Standardisation in Cell and Tissue Engineering*. Woodhead Publishing Limited, 2013. 276 s. ISBN 978-0-85709-419-3
- [22] SEVILLA, C.A., DALECKI, D., HOCKING, D.C. Extracellular Matrix Fibronectin Stimulates the Self-Assembly of Microtissues on Native Collagen Gels. *Tissue Eng Part A* [online]. 2010, vol. 16 (12), s. 3805-3819

- [cit. 13.05.2020]. Dostupné z:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2991203/>
- [23] NECAS, J., BARTOSIKOVA, L., BRAUNER, P., KOLAR, J. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina* [online]. 2008, vol. 53, s. 397–411 [cit. 30.11.2019]. Dostupné z: <http://www.vri.cz/docs/vetmed/53-8-397.pdf>
- [24] RÜDINGER, F., LAVRENTIEVA, A., BLUME, C. Hydrogels for 3D mammalian cell culture: A starting guide for laboratory practice. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2015, vol. 99, s. 623–636 [cit. 30.11.2019]. Dostupné z:
https://www.researchgate.net/publication/269115738_Hydrogels_for_3D_mammalian_cell_culture_A_starting_guide_for_laboratory_practice
- [25] TIBBITT, M. W., ANSETH, K. S. Hydrogels as Extracellular Matrix Mimics for 3D Cell Culture. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 2009, vol. 103, no. 4, s. 655–663 [cit. 30.11.2019]. Dostupné z:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2997742/>
- [26] *Fluorescence SpectraViewer* [online]. [cit. 27.12.2019]. Dostupné z:
<https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>
- [27] *CellTracker™ Green CMFDA Dye* [online]. [cit. 13.05.2017]. Dostupné z:
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C7025#/C7025>
- [28] *CellTracker™ Red CMTPX Dye* [online]. [cit. 13.05.2017]. Dostupné z:
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C34552?SID=srch-srp-C34552#/C34552?SID=srch-srp-C34552>
- [29] *Počítání krevních elementů* [online]. [cit. 31.12.2019]. Dostupné z:
http://projekty.sosvet.cz/2006_hematologie/04_pocitani.htm
- [30] *Index of /docs/img/databaze/genetika/slides* [online]. [cit. 27.12.2019]. Dostupné z:
<http://atraktivnibiologie.upol.cz/docs/img/databaze/genetika/slides/>
- [31] MOK, P-L., LEONG, C-F., CHEONG, S-K. Cellular mechanisms of emerging applications of mesenchymal stem cells. *Malaysian J Pathol* [online]. 2013, vol. 35, s. 17–32 [cit. 27.05.2020]. Dostupné z:
<http://www.mjpath.org.my/2013.1/mesenchymal-stem-cells.pdf>
- [32] *Chemotaxis Application Guide*. Chemotaxis and Migration Tool [online]. [cit. 22.05.2020]. Dostupné z:
https://ibidi.com/img/cms/resources/AG/FL_AG_035_Chemotaxis_150dpi.pdf